



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日 2001年1月18日 (18.01.2001) PCT WO 01/04298 A1

(10) 国際公開番号

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 9/10, C07K 14/07, 16/18, 7/08, C12P 21/02, A61K 39/10, S10/17, A61P 25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/10, 27/00, G01N 33/53, 33/56

(52) 国際出願番号: PCT/JP0004484
(22) 国際出願日: 2000年7月6日 (06.07.2000)

(25) 国際公開の言語: 日本国語

(26) 国際公開の言語: 日本国語

(30) 受先権データ: 特開平11/19491 1999年7月8日 (03.07.1999) JP

(71) 出願人(米国)についての旨: 武田英品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 告明者: および

(73) 免除者: (米国)についての旨: 関根 周 (SUGO,
Takuya) [JP/JP]; 〒100-3261 東京都渋谷区宇治山内2丁
目7番地26 テクノタワー東京301号 Ibaraki (JP); 福原
尊希 (KURIBA, Motohi) [JP/JP]; 〒300-2436 宮城県
仙台市若林区柳町1丁目19番2号 Ibaraki (JP); 北田
千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(74) 告明者: および

(75) 免除者: (出願人(米国): 〒100-3261 東京都渋谷区宇治山内2丁
目7番地26 テクノタワー東京301号 Ibaraki (JP); 福原
尊希 (KURIBA, Motohi) [JP/JP]; 〒300-2436 宮城県
仙台市若林区柳町1丁目19番2号 Ibaraki (JP); 北田
千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府
四丁目1番1号 Osaka (JP))

(51) 国際特許分類: C12N 17/27, 17/28, 17/29, 17/30, 17/31, 17/32, 17/33, 17/34, 17/35, 17/36, 17/37, 17/38, 17/39, 17/40, 17/41, 17/42, 17/43, 17/44, 17/45, 17/46, 17/47, 17/48, 17/49, 17/50, 17/51, 17/52, 17/53, 17/54, 17/55, 17/56, 17/57, 17/58, 17/59, 17/60, 17/61, 17/62, 17/63, 17/64, 17/65, 17/66, 17/67, 17/68, 17/69, 17/70, 17/71, 17/72, 17/73, 17/74, 17/75, 17/76, 17/77, 17/78, 17/79, 17/80, 17/81, 17/82, 17/83, 17/84, 17/85, 17/86, 17/87, 17/88, 17/89, 17/90, 17/91, 17/92, 17/93, 17/94, 17/95, 17/96, 17/97, 17/98, 17/99, 17/100, 17/101, 17/102, 17/103, 17/104, 17/105, 17/106, 17/107, 17/108, 17/109, 17/110, 17/111, 17/112, 17/113, 17/114, 17/115, 17/116, 17/117, 17/118, 17/119, 17/120, 17/121, 17/122, 17/123, 17/124, 17/125, 17/126, 17/127, 17/128, 17/129, 17/130, 17/131, 17/132, 17/133, 17/134, 17/135, 17/136, 17/137, 17/138, 17/139, 17/140, 17/141, 17/142, 17/143, 17/144, 17/145, 17/146, 17/147, 17/148, 17/149, 17/150, 17/151, 17/152, 17/153, 17/154, 17/155, 17/156, 17/157, 17/158, 17/159, 17/160, 17/161, 17/162, 17/163, 17/164, 17/165, 17/166, 17/167, 17/168, 17/169, 17/170, 17/171, 17/172, 17/173, 17/174, 17/175, 17/176, 17/177, 17/178, 17/179, 17/180, 17/181, 17/182, 17/183, 17/184, 17/185, 17/186, 17/187, 17/188, 17/189, 17/190, 17/191, 17/192, 17/193, 17/194, 17/195, 17/196, 17/197, 17/198, 17/199, 17/200, 17/201, 17/202, 17/203, 17/204, 17/205, 17/206, 17/207, 17/208, 17/209, 17/210, 17/211, 17/212, 17/213, 17/214, 17/215, 17/216, 17/217, 17/218, 17/219, 17/220, 17/221, 17/222, 17/223, 17/224, 17/225, 17/226, 17/227, 17/228, 17/229, 17/230, 17/231, 17/232, 17/233, 17/234, 17/235, 17/236, 17/237, 17/238, 17/239, 17/240, 17/241, 17/242, 17/243, 17/244, 17/245, 17/246, 17/247, 17/248, 17/249, 17/250, 17/251, 17/252, 17/253, 17/254, 17/255, 17/256, 17/257, 17/258, 17/259, 17/260, 17/261, 17/262, 17/263, 17/264, 17/265, 17/266, 17/267, 17/268, 17/269, 17/270, 17/271, 17/272, 17/273, 17/274, 17/275, 17/276, 17/277, 17/278, 17/279, 17/280, 17/281, 17/282, 17/283, 17/284, 17/285, 17/286, 17/287, 17/288, 17/289, 17/290, 17/291, 17/292, 17/293, 17/294, 17/295, 17/296, 17/297, 17/298, 17/299, 17/300, 17/301, 17/302, 17/303, 17/304, 17/305, 17/306, 17/307, 17/308, 17/309, 17/310, 17/311, 17/312, 17/313, 17/314, 17/315, 17/316, 17/317, 17/318, 17/319, 17/320, 17/321, 17/322, 17/323, 17/324, 17/325, 17/326, 17/327, 17/328, 17/329, 17/330, 17/331, 17/332, 17/333, 17/334, 17/335, 17/336, 17/337, 17/338, 17/339, 17/340, 17/341, 17/342, 17/343, 17/344, 17/345, 17/346, 17/347, 17/348, 17/349, 17/350, 17/351, 17/352, 17/353, 17/354, 17/355, 17/356, 17/357, 17/358, 17/359, 17/360, 17/361, 17/362, 17/363, 17/364, 17/365, 17/366, 17/367, 17/368, 17/369, 17/370, 17/371, 17/372, 17/373, 17/374, 17/375, 17/376, 17/377, 17/378, 17/379, 17/380, 17/381, 17/382, 17/383, 17/384, 17/385, 17/386, 17/387, 17/388, 17/389, 17/390, 17/391, 17/392, 17/393, 17/394, 17/395, 17/396, 17/397, 17/398, 17/399, 17/400, 17/401, 17/402, 17/403, 17/404, 17/405, 17/406, 17/407, 17/408, 17/409, 17/410, 17/411, 17/412, 17/413, 17/414, 17/415, 17/416, 17/417, 17/418, 17/419, 17/420, 17/421, 17/422, 17/423, 17/424, 17/425, 17/426, 17/427, 17/428, 17/429, 17/430, 17/431, 17/432, 17/433, 17/434, 17/435, 17/436, 17/437, 17/438, 17/439, 17/440, 17/441, 17/442, 17/443, 17/444, 17/445, 17/446, 17/447, 17/448, 17/449, 17/450, 17/451, 17/452, 17/453, 17/454, 17/455, 17/456, 17/457, 17/458, 17/459, 17/460, 17/461, 17/462, 17/463, 17/464, 17/465, 17/466, 17/467, 17/468, 17/469, 17/470, 17/471, 17/472, 17/473, 17/474, 17/475, 17/476, 17/477, 17/478, 17/479, 17/480, 17/481, 17/482, 17/483, 17/484, 17/485, 17/486, 17/487, 17/488, 17/489, 17/490, 17/491, 17/492, 17/493, 17/494, 17/495, 17/496, 17/497, 17/498, 17/499, 17/500, 17/501, 17/502, 17/503, 17/504, 17/505, 17/506, 17/507, 17/508, 17/509, 17/510, 17/511, 17/512, 17/513, 17/514, 17/515, 17/516, 17/517, 17/518, 17/519, 17/520, 17/521, 17/522, 17/523, 17/524, 17/525, 17/526, 17/527, 17/528, 17/529, 17/530, 17/531, 17/532, 17/533, 17/534, 17/535, 17/536, 17/537, 17/538, 17/539, 17/540, 17/541, 17/542, 17/543, 17/544, 17/545, 17/546, 17/547, 17/548, 17/549, 17/550, 17/551, 17/552, 17/553, 17/554, 17/555, 17/556, 17/557, 17/558, 17/559, 17/560, 17/561, 17/562, 17/563, 17/564, 17/565, 17/566, 17/567, 17/568, 17/569, 17/570, 17/571, 17/572, 17/573, 17/574, 17/575, 17/576, 17/577, 17/578, 17/579, 17/580, 17/581, 17/582, 17/583, 17/584, 17/585, 17/586, 17/587, 17/588, 17/589, 17/590, 17/591, 17/592, 17/593, 17/594, 17/595, 17/596, 17/597, 17/598, 17/599, 17/600, 17/601, 17/602, 17/603, 17/604, 17/605, 17/606, 17/607, 17/608, 17/609, 17/610, 17/611, 17/612, 17/613, 17/614, 17/615, 17/616, 17/617, 17/618, 17/619, 17/620, 17/621, 17/622, 17/623, 17/624, 17/625, 17/626, 17/627, 17/628, 17/629, 17/630, 17/631, 17/632, 17/633, 17/634, 17/635, 17/636, 17/637, 17/638, 17/639, 17/640, 17/641, 17/642, 17/643, 17/644, 17/645, 17/646, 17/647, 17/648, 17/649, 17/650, 17/651, 17/652, 17/653, 17/654, 17/655, 17/656, 17/657, 17/658, 17/659, 17/660, 17/661, 17/662, 17/663, 17/664, 17/665, 17/666, 17/667, 17/668, 17/669, 17/670, 17/671, 17/672, 17/673, 17/674, 17/675, 17/676, 17/677, 17/678, 17/679, 17/680, 17/681, 17/682, 17/683, 17/684, 17/685, 17/686, 17/687, 17/688, 17/689, 17/690, 17/691, 17/692, 17/693, 17/694, 17/695, 17/696, 17/697, 17/698, 17/699, 17/700, 17/701, 17/702, 17/703, 17/704, 17/705, 17/706, 17/707, 17/708, 17/709, 17/710, 17/711, 17/712, 17/713, 17/714, 17/715, 17/716, 17/717, 17/718, 17/719, 17/720, 17/721, 17/722, 17/723, 17/724, 17/725, 17/726, 17/727, 17/728, 17/729, 17/730, 17/731, 17/732, 17/733, 17/734, 17/735, 17/736, 17/737, 17/738, 17/739, 17/740, 17/741, 17/742, 17/743, 17/744, 17/745, 17/746, 17/747, 17/748, 17/749, 17/750, 17/751, 17/752, 17/753, 17/754, 17/755, 17/756, 17/757, 17/758, 17/759, 17/760, 17/761, 17/762, 17/763, 17/764, 17/765, 17/766, 17/767, 17/768, 17/769, 17/770, 17/771, 17/772, 17/773, 17/774, 17/775, 17/776, 17/777, 17/778, 17/779, 17/780, 17/781, 17/782, 17/783, 17/784, 17/785, 17/786, 17/787, 17/788, 17/789, 17/790, 17/791, 17/792, 17/793, 17/794, 17/795, 17/796, 17/797, 17/798, 17/799, 17/800, 17/801, 17/802, 17/803, 17/804, 17/805, 17/806, 17/807, 17/808, 17/809, 17/810, 17/811, 17/812, 17/813, 17/814, 17/815, 17/816, 17/817, 17/818, 17/819, 17/820, 17/821, 17/822, 17/823, 17/824, 17/825, 17/826, 17/827, 17/828, 17/829, 17/830, 17/831, 17/832, 17/833, 17/834, 17/835, 17/836, 17/837, 17/838, 17/839, 17/840, 17/841, 17/842, 17/843, 17/844, 17/845, 17/846, 17/847, 17/848, 17/849, 17/850, 17/851, 17/852, 17/853, 17/854, 17/855, 17/856, 17/857, 17/858, 17/859, 17/860, 17/861, 17/862, 17/863, 17/864, 17/865, 17/866, 17/867, 17/868, 17/869, 17/870, 17/871, 17/872, 17/873, 17/874, 17/875, 17/876, 17/877, 17/878, 17/879, 17/880, 17/881, 17/882, 17/883, 17/884, 17/885, 17/886, 17/887, 17/888, 17/889, 17/890, 17/891, 17/892, 17/893, 17/894, 17/895, 17/896, 17/897, 17/898, 17/899, 17/900, 17/901, 17/902, 17/903, 17/904, 17/905, 17/906, 17/907, 17/908, 17/909, 17/910, 17/911, 17/912, 17/913, 17/914, 17/915, 17/916, 17/917, 17/918, 17/919, 17/920, 17/921, 17/922, 17/923, 17/924, 17/925, 17/926, 17/927, 17/928, 17/929, 17/930, 17/931, 17/932, 17/933, 17/934, 17/935, 17/936, 17/937, 17/938, 17/939, 17/940, 17/941, 17/942, 17/943, 17/944, 17/945, 17/946, 17/947, 17/948, 17/949, 17/950, 17/951, 17/952, 17/953, 17/954, 17/955, 17/956, 17/957, 17/958, 17/959, 17/960, 17/961, 17/962, 17/963, 17/964, 17/965, 17/966, 17/967, 17/968, 17/969, 17/970, 17/971, 17/972, 17/973, 17/974, 17/975, 17/976, 17/977, 17/978, 17/979, 17/980, 17/981, 17/982, 17/983, 17/984, 17/985, 17/986, 17/987, 17/988, 17/989, 17/990, 17/991, 17/992, 17/993, 17/994, 17/995, 17/996, 17/997, 17/998, 17/999, 17/1000, 17/1001, 17/1002, 17/1003, 17/1004, 17/1005, 17/1006, 17/1007, 17/1008, 17/1009, 17/1010, 17/1011, 17/1012, 17/1013, 17/1014, 17/1015, 17/1016, 17/1017, 17/1018, 17/1019, 17/1020, 17/1021, 17/1022, 17/1023, 17/1024, 17/1025, 17/1026, 17/1027, 17/1028, 17/1029, 17/1030, 17/1031, 17/1032, 17/1033, 17/1034, 17/1035, 17/1036, 17/1037, 17/1038, 17/1039, 17/1040, 17/1041, 17/1042, 17/1043, 17/1044, 17/1045, 17/1046, 17/1047, 17/1048, 17/1049, 17/1050, 17/1051, 17/1052, 17/1053, 17/1054, 17/1055, 17/1056, 17/1057, 17/1058, 17/1059, 17/1060, 17/1061, 17/1062, 17/1063, 17/1064, 17/1065, 17/1066, 17/1067, 17/1068, 17/1069, 17/1070, 17/1071, 17/1072, 17/1073, 17/1074, 17/1075, 17/1076, 17/1077, 17/1078, 17/1079, 17/1080, 17/1081, 17/1082, 17/1083, 17/1084, 17/1085, 17/1086, 17/1087, 17/1088, 17/1089, 17/1090, 17/1091, 17/1092, 17/1093, 17/1094, 17/1095, 17/1096, 17/1097, 17/1098, 17/1099, 17/1100, 17/1101, 17/1102, 17/1103, 17/1104, 17/1105, 17/1106, 17/1107, 17/1108, 17/1109, 17/1110, 17/1111, 17/1112, 17/1113, 17/1114, 17/1115, 17/1116, 17/1117, 17/1118, 17/1119, 17/1120, 17/1121, 17/1122, 17/1123, 17/1124, 17/1125, 17/1126, 17/1127, 17/1128, 17/1129, 17/1130, 17/1131, 17/1132, 17/1133, 17/1134, 17/1135, 17/1136, 17/1137, 17/1138, 17/1139, 17/1140, 17/1141, 17/1142, 17/1143, 17/1144, 17/1145, 17/1146, 17/1147, 17/1148, 17/1149, 17/1150, 17/1151, 17/1152, 17/1153, 17/1154, 17/1155, 17/1156, 17/1157, 17/1158, 17/1159, 17/1160, 17/1161, 17/1162, 17/1163, 17/1164, 17/1165, 17/1166, 17/1167, 17/1168, 17/1169, 17/1170, 17/1171, 17/1172, 17/1173, 17/1174, 17/1175, 17/1176, 17/1177, 17/1178, 17/1179, 17/1180, 17/1181, 17/1182, 17/1183, 17/1184, 17/1185, 17/1186, 17/1187, 17/1188, 17/1189, 17/1190, 17/1191, 17/1192, 17/1193, 17/1194, 17/1195, 17/1196, 17/1197, 17/1198, 17/1199, 17/1200, 17/1201, 17/1202, 17/1203, 17/1204, 17/1205, 17/1206, 17/1207, 17/1208, 17/1209, 17/1210, 17/1211, 17/1212, 17/1213, 17/1214, 17/1215, 17/1216, 17/1217, 17/1218, 17/1219, 17/1220, 17/1221, 17/1222, 17/1223, 17/1224, 17/1225, 17/1226, 17/1227, 17/1228, 17/1229, 17/1230, 17/1231, 17/1232, 17/1233, 17/1234, 17/1235, 17/1236, 17/1237, 17/1238, 17/1239, 17/1240, 17/1241, 17/1242, 17/1243, 17/1244, 17/1245, 17/1246, 17/12

明細書

5 技術分野

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であるS E N R (sensory epithelium neuropeptide-like receptor)に対する新規ポリペプチド、及びこれらをコードするDNAに関する。

がクローニングされている(Liberti, F., et al. Science, 244, 569-572, 1989, Welch, S. K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 606-613, 1995, Marchese, A., et al., Genomics, 23, 609-618, 1994, Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995)。また、ゲノムDNAあるいはcDNAのランダムな配列決定によつても、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が次々と見出されてゐる(Nomura, N., et al., DNA Research 1巻, 27-35頁, 1994年)。これらの、一ファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定するしかなかつた。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものが多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターがみつかつてゐることから対応する未知のリガンドがまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実際におーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少ない。

最近、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを導入し、新規オピオイドペプチドを探索した例が報告されている(Reinshied, R. K., et al., Science, 270巻, 792-794頁, 1995年, Menulah, J.-C., et al., Nature 377巻, 532-535頁, 1995年)。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属することが予想されていた。オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人为的に合成した化合物群の中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体cDNA導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。

またカツツミリのオーファンG蛋白質共役型レセプター (GRL 1 0 4) をコードするcDNAをCHO細胞に導入してレセプター発現細胞での特異的な

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターとの相互作用を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもつてゐることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと統称される。

このように生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覺受容などの生体にとつて重要な機能調節が行なわれている。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプター蛋白質が存在し、その機能調節に重要な役割を果たしていることがわかつてゐるが、未知の作用物質(ホルモンや神経伝達物質など)およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについては未だ不明なことが多い。

近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する)法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになり、数多くの、リガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質

細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を指標として新規生理活性ペプチドを同定した例が報告されているが (Cox, K. J. A., et al., J. Neurosci., 17(4), 1197-1205, 1997)、この新規生理活性ペプチドは既知のleukokininと高い相同性を有し、GRL104は既知のleukokininとの反応性もあった。このようにオーフアンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中リガンドがおおよそ推定されるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

オーフアンG蛋白質共役型レセプターとして報告されているもの一つにSEN Rがある (Ial, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 752-759, 1995)。SEN Rはシマトスタンレセプター (SSTR4) と低いホモロジーがあるが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。なお、Marchese, A. らによつて報告されたGPR14 (Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995) はSEN Rと同一のレセプターである。

中枢神経系、循環器系、生殖器系、免疫系、消化器、泌尿器系器官、感覺器官等で発現しているG蛋白質共役型レセプターであるSEN Rに対するリガンドは、医薬として有用であると考えられるが、これまでにその構造および機能については明らかにされていない。

タミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：1-4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 (2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1-5、配列番号：2-7、配列番号：3-1、配列番号：3-2、配列番号：3-3または配列番号：3-4で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチド、
 (3) 配列番号：1-4、配列番号：1-5、配列番号：2-7、配列番号：3-2、配列番号：3-3または配列番号：3-4で表されるアミノ酸配列を有する上記(1)記載のポリペプチド、
 (4) 上記(1)記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
 (5) 配列番号：1-3または配列番号：2-6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(4)記載の前駆体タンパク質、
 (6) 上記(1)記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、
 (7) 配列番号：1-6、配列番号：1-7、配列番号：2-8、配列番号：3-5、配列番号：3-6、配列番号：3-7または配列番号：3-8で表される塩基配列を有する上記(6)記載のDNA、
 (8) 上記(4)記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有するDNA Aを含有するDNA、
 (9) 配列番号：1-2または配列番号：2-5で表される塩基配列を有する上記(8)記載のDNA、
 (10) 上記(6)または(8)記載のDNAを含有する組換えベクター、
 (11) 上記(10)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
 (12) 上記(11)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造。

(1) 配列番号：1-4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグル

造法、

(13) 上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

(14) 上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬

(15) 上記(6)または(8)記載のDNAを含有してなる医薬、

(16) 中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤または感覺器官機能調節剤である上記(14)または(1

5)記載の医薬、

(17) 上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴

とするSEN Rと上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆

体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性

を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパ

ク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴

とするSEN Rと上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆

体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性

を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(19) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のス

クリーニング用キットを用いて得られる、SEN Rと上記(1)記載のポリペ

プチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそ

のエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(20) 上記(13)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載の

ポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドも

しくはそのエステルまたはその塩が関与する疾患の診断剤などに関する。

さらに、本発明は、

(22) 哺乳動物由来である上記(1)記載のポリペプチド、または上記(

4)記載の前駆体タンパク質、および

(23) 高血压症、低血圧症、心疾患、心疾患、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚障

害、視覚異常などの疾患の治療・予防剤である上記(14)または(15)

記載の医薬などを提供するものである。

本発明におけるポリペプチドに対するSEN Rに関して、具体的には、上述

の公知のSEN Rまたはその塩などがあげられるのみならず、

(24) 配列番号：29または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同

一もしくは東洋的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするSEN R

またはその塩、または

(25) 蛋白質が、配列番号：29または配列番号：30で表わされるアミノ

酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が

欠失したアミノ酸配列、配列番号：30で表わされるア

ミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸

が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：29また

は配列番号：30で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好まし

くは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸

を含有する蛋白質である上記(24)記載のSEN Rまたはその塩などが

示される。

図面の簡単な説明

図1はラット脊髄cDNAより単離したラットurotensin like peptide前駆体蛋白

白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるラットurotensin like peptide前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

図2はマウス脊髄cDNAより単離したマウスurotensin like peptide前駆体蛋白

白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるマウスurotensin like peptide前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

図3は合成ラットurolensin like peptide-2のCHO/tSEN R細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

5 本明細書において、「実質的に同一」とはタンパク質の活性、例えば、リガンドと受容体(SENR)の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした10 順序、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。核アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアラニン、ロイシン、イソロイシン、パリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挿げられる。極性(中性)アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挿げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挿げられる。負電荷をもつ(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挿げられる。

15 本発明のポリペプチドは、SENRに対するリガンドであり、具体的には、配列番号：14で表されるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン酸配列またはピログルタミン酸配列を有し配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドや、そのアミド、そのエヌカルおよびそれらの塩など(以下、本発明のポリペプチドと略称する場合がある)があげられる。

20 本発明のポリペプチドは、SENRに対するアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン酸配列またはピログルタミン酸配列を有し配列番号：14で表されるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド、そのアミド、そのエヌカルおよびそれらの塩など(以下、本発明のポリペプチドと略称する場合がある)があげられる。

25 本発明のポリペプチド、その製造法および用途を以下にさらに詳細する。

本発明の上記ポリペプチドとしては、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる組織(たとえ

ば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するポリペプチドであって、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。例えば、本発明のポリペプチドとしては、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどに他に、N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチド(例えば、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなど)などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとして具体的には、例えば、(1)①N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し、②配列番号：14で表されるアミノ酸配列のN末端から第8番目(Ala)から第17番目(lle)までのアミノ酸配列を有し、14～17個のアミノ酸残基からなるポリペプチドや(2)①N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し、②配列番号：14で表されるアミノ酸配列のN末端から第8番目(Ala)から第17番目(lle)までのアミノ酸配列を有し、③14～17個のアミノ酸残基からなるポリペプチドのN末端にさらに④3～10個のアミノ酸残基が付加されたポリペプチドなどがあげられる。

なかでも、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列を有す

るポリペプチドなどが好ましい例としてあげられる。

本明細書におけるポリペプチドはペプチド標配の慣例に従つて左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。①配列番号：14で表されるアミノ酸配列、②配列番号：15で表されるアミノ酸配列、③配列番号：27で表されるアミノ酸配列、④配列番号：31で表されるアミノ酸配列、⑤配列番号：32で表されるアミノ酸配列、⑥配列番号：33で表されるアミノ酸配列、⑦配列番号：34で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であつてもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、リーブロビル、イソプロピルもしくはアリーブチルなどのC₁~₆アルキル基、シクロベンチル、シクロヘキシルなどのC₃~₈シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどのC₆~₁₁アルキル基、ベンジル、フェニチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁~₂アルキルもしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル基、C₁~₂アルキル基などのC₇~₁₀アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基(例えばアルカリ金属など)や酸(有機酸、無機酸)との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えばアルカリ金属などの塩(リノ酸、リン酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、甘酸、プロピオノン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

上記したように本発明のポリペプチドは、自体公知のポリペプチドの合成分に従つて、あるいは本発明のポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なブチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによつても良い。すなわち、本発明のポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離についてはたとえば、以下の①~⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers, New York (1966年)

② SchroederおよびKuethe、ザ ペプチド (The Peptide)、Academic Press, New York (1965年)

③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④ 矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤ 矢島治明監修、純医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ポリペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリアルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-

ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリアルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルエニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-2',4'-ジメトキシフェニル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドを得る。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-シジソブロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノ)ブロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBI、HOOBtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたはHOBIエストラルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択される。たとえばN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのエーテリシンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどの二トリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。

反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリ

ン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メチルベンジルオキシカルボニル、Cl-L、Br-L、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフエニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁-6アルキル基、C₃-6シクロアルキル基、C₇-14アラルキル基の他、2-アーダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブチカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができます。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、ニートラル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピリジル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzI、C₁-BzI、2-ニトロベンジル、Br-L、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンジルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アシド、活性エステル〔アルコール(たとえば、ベンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアル

ルコール、バラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBt]とのエステル]などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらとの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ビペラジン、ビペリジン、ビペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニアナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、バラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジオール、1,2-エタンジオールのようなカチオン捕獲剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリブトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジオール、1,4-ブタンジオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によつても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ポリペプチドのアミド体を得る別の方針としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド(またはアミノ酸)とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で結合させる。結合反応については上記と同様である。結合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドで

のアミド体を得ることができる。

ポリペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチドとしては、上記した配列番号：14で表されるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該ポリペプチドと同様の作用、例えば中枢機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用または感覺器官機能調節作用などを有しているものであれば、どのようなポリペプチドであつてもよい。

本発明のポリペプチドはさらに該ポリペプチドに対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのポリペプチドは上記した本発明のポリペプチドの他に、上記本発明のポリペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどのが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であつてもよい。ここでエステル基の例としては上記したポリペプチドの場合と同様である。該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエスチル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：14で表されるアミノ酸配列のN末端から5番目(His)および6番目(Gly)を含有する2ないし16個のアミノ酸を含有するアミノ酸配列からなるペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であつてもよい。
本発明のポリペプチドの部分ペプチドの塩としては、前述のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。
本発明のポリペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記したポリペプチドの場合と同様の合成法に従つて、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：1-4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：1-4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA（以下、本発明のDNAと略称する場合がある）であればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいすれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものと用いて直接Reverse

によって増幅することもできる。
ここで、配列番号：1-4で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：1-6で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：1-5で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：1-7で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：2-7で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：2-8で表されるアミノ酸配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：3-1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

ドをコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：3 5と表される塩基配列を有するDNAを含むDNAなどがあげられ、配列番号：3 6で表されるポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAとしては、3 2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAを含むDNAなどがあげられ、配列番号：3 3で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3 7で表されるDNAなどがあげられ、配列番号：3 3で表されるDNAを含むDNAなどがあげられ、配列番号：3 4で表される塩基配列を有するDNAを含むDNAなどがあげられ、配列番号：3 5で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3 8で表される塩基配列を有するDNAを含むDNAとしては、N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：1 4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するDNAとしては、例えば、（1）5'末端から3塩基がCAAであり、配列番号：1 6で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAを含有するDNAや（2）さらに5'末端に9～30個の塩基が付加したDNAなどがあげられる。

N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：1 4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するDNAとしては、例えば、①配列番号：1 6、配列番号：3 6、配列番号：3 5、配列番号：3 5、配列番号：3 6、配列番号：3 7または配列番号：3 8で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が欠失した塩基配列、②配列番号：1 6、配列番号：1 7、配列番号：2 8、配列番号：3 5、配列番号：3 6、配列番号：3 7または配列番号：3 8で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が付加した塩基配列、③配列番号：1 6、配列番号：3 6、配列番号：3 7または配列番号：3 8で表される塩

基配列中の1または2個以上(好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の塩基が挿入された塩基配列、④配列番号：16、配列番号：17、配列番号：28、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37または配列番号：38で表される塩基配列中の1または2個以上(好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の他の塩基で置換された塩基配列、または⑤それらを組み合わせた塩基配列を有するDNAを含するDNAなども含まれる。

より具体的には、(1)ストリンジエントな条件下で配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質に対する結合能を有するDNAを含するDNAの有する配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(2)遺伝コードの縮量のため配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質に対する結合能を有するDNAを含するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば4.2℃、5.0%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM Na₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAを有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNAとしては、例えば、5'末端から3塩基がCAAであり、配列番号：16で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最

も好ましくは約95%以上の相同意を有する塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

また、本発明の①配列番号：14で表わされるアミノ酸配列などを有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法にても製造することができる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブライマー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えば本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えばMolecular Cloning(2nd ed. : J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従つて行われる。また、市販のライブライマーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従つて行う。

クローニングされた本発明のポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由來のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由來のプラスミド(例、pUB11)

0, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどが利用できる。宿主がエシエリヒア属菌では、T1プロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、rPLプロモーター、rP01プロモーター、rP02プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母では、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞では、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えは、シビドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンビシリコン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞を用いてDHF^rR遺伝子を選択マークとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシエリヒア属菌では、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌では、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブカリシン・シグナル配列などがある場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブカリシン・シグナル配列などがある。

5 などが、宿主が酵母では、メイティングファクターα(MFa)・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞では、
例えはインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列
、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシエリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫は星虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシエリヒア属菌としては、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1(プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、60巻、160(1968)、JM103(スクリック・アシックス・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981)、JA221(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)、120巻、517(1978)、HB101(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969))、C600(ジェネティクス(Genetics)、39巻、440(1954))などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) M1114(ジーン、24巻、255(1983))、207-21(ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984))などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-1A, DKD-5D, 20B-1などが用いられる。

昆虫としては、例えはカイコの幼虫などが用いられる(前田ら、ネイチャー(Nature)、315巻、592(1985))。

昆虫細胞としては、例えは、ウィルスがACNPVの場合は、夜盜蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra

brassicae由來の細胞または*Esigmena acrea*由來の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由來株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィトロ (*In Vitro*) , 1卷, 213-217頁 (1977年)) などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOO (*dhfr*-CHO細胞) 、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞BALB3T3細胞、SD-2/O細胞などが用いられる。

エシエリヒア属細胞を形質転換するには、たとえばプローシーシングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従つて行なわれる。

バチス属細胞を形質転換するには、たとえばモレキラー・アンド・ジェネラル・ジエネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従つて行なわれる。

酵母を形質転換するには、たとえばプローシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978) に記載の方法に従つて行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオノテクノロジー (BioTechnology) , 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従つて行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従つて行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リボフェクション法 (Felgner, P. L. et al. , プローシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーワスエー (Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America) , 84巻, 7413頁 (1987年)) 、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. , ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456-467頁 (1973年)) 、電気穿孔法 (Neumann, E. et al. , エンボル (EMBO J.) , 1巻, 85巻, 213-217頁 (1982年)) 等が挙げられる。

このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のポリペプチドを安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローニング選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マークを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マークを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローニング選択を行なうことにより本発明のポリペプチドの高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができ。また、*dhfr*遺伝子を選択マークとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、*dhfr*遺伝子とともに、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明のポリペプチドをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のポリペプチドを生成、蓄積せしめることによって、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主がエシエリヒア属菌、バチス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカーペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5-8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM 9培地〔ミラー(Miller)、ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association)199巻, 519(1967)〕、1.9倍地〔ブローシーニング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約1.5～6.0時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約1.5～4.3℃で約3～2.4時間行い、必要により、通気や搅拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバーグホールダー(Burkholder)最小倍地〔Bostian, K. L.ら、「ブローシーニングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、77巻, 4505(1990)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Biller, G. A.ら、「ブローシーニングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、81巻, 5330(1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約2.4～7.2時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium(Grace, T. C.、ナイチャー(Nature)、195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science)、122巻、501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロジー(Virology)、8巻、3

96(1959)〕、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association)199巻, 519(1967)〕、1.9倍地〔ブローシーニング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約1.5～6.0時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

特にCHO(dhfr)細胞およびdihf1遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析シ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび／または凍融融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適用される。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100(登録商標。以下、TMと省略することがある。)など界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清を分離し、上清を集め。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明の示リペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶液沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマ

トフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。
かくして得られる本発明のポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が產生する本発明のポリペプチドを、精製前または精製後に適當な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のポリペプチドは、①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③SENRのリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、④組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、

⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覺器官機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

特に、後述の組換え型SENRの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSENRアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記⑦に申し、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは中枢神経系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覺器官系などで発現しているSENRがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNA

△は中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覺器官官調節作用などに關与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ビック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病的治療・予防剤として用いることができる。

本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従つて実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。

これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適當な用量が得られるようになります。

本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアシエーテッドウイルスベクターなどの適當なベクターに挿入した後、常套手段に従つて実施することができる。

錠剤、カプセル剤などに混和することができるとしては、例えばゼラチン、コーンスター、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーヌスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ベバーミント、アカモノ油またはチエリーのようないわばの香料などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油

などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させることができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばブリレンジグリコール、ポリエチレンジコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（^{TN}）_、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンジコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イス、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1から1.0mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から2.0mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の心不全患者（体重60kgとして）への投与においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から2.0mg程度、より好ましくは約0.1から1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のポリペプチドの前駆体タンパク質、その製造法および用途を以下に

さらに詳細に説明する。

本発明の上記ポリペプチドの前駆体タンパク質、そのアミド、そのエステルまたはその塩（以下、本発明の前駆体タンパク質と称する場合がある）としては、例えば、前記した本発明のタンパク質のN末端または（および）C末端に1個または2個以上、好ましくは1～200個程度、より好ましくは1～120個程度、さらに好ましくは50～120個程度のアミノ酸が結合したタンパク質である。

具体的には、本発明の前駆体タンパク質は、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質などが用いられる。

より具体的には、配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号：14、配列番号：15、配列番号：31または配列番号：32で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの前駆体の例として、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号：27、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの前駆体の例としてあげられる。

また、本発明の前駆体タンパク質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するタンパク質であって、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質であれば如何なるものであつてもよい。実質的に同質の活性としては、例えはレセプタ一結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプタ一結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがつて、レセプタ一結合活性の強さなどの強弱、タンパク質の分子量などの量的要素は異なつてもよい。

配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と実質的に

同一のアミノ酸配列として具体的には、配列番号：1 3または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列と約 5 0 %以上、好ましくは約 6 0 %以上、さらに好ましくは約 7 0 %以上、より好ましくは約 8 0 %以上、特に好ましくは約 9 0 %以上、最も好ましくは約 9 5 %以上の相容性を有するアミノ酸配列を示す。

5 また、本発明の前駆体タンパク質としては、例えば、①配列番号：1 3または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは 1 ～ 3 0 個程度、好ましくは、1 ～ 1 0 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは 1 ～ 3 0 個程度、好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは 1 ～ 3 0 個程度、好ましくは、1 ～ 1 0 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは 1 ～ 3 0 個程度、好ましくは、1 ～ 1 0 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども含まれる。

10 本明細書における前駆体タンパク質はペプチド標記の慣例に従つて左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。例えば、配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列などを含有する本発明の前駆体タンパク質は C 末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C 末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であつてもよい。エステルの R としては、例えばメチル、エチル、n-ブロピル、イソブロピルもしくはn-オーブチルなどの C₁～₄ アルキル基、シクロヘキシルなどの C₅～₈ シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどの C₆～₁₂ アリール基、ベンジル、フェニチル、ベンゼンズヒドリルなどのフェニル-C₁～₂ アルキル、もしくは α-ナフチルメチルなどの

15 20 25

α-ナフチル-C₁～₃ アルキルなどの C₁～₄ アラルキル基のほか、経口用エスケルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

本発明の前駆体タンパク質としては、例えば、上記の本発明のポリペプチドの塩として例示したものと同様のものなどがあげられる。

5 本発明の前駆体タンパク質は、ヒトや温血動物の組織または細胞からターニング質を精製する方法によつて製造するごともできるし、後述のタンパク質法に準じて製造することもできる。また、後述するタンパク質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによつても製造することができる。

ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル通過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

上記したように本発明の前駆体タンパク質は、自体公知のタンパク質の合成法に従つて、あるいは本発明のタンパク質を含有するタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、上記と同様の方法などが用いられる。

本発明の前駆体タンパク質のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂としては例えば、上記した市販のペプチド合成用樹脂などが用いられる。このような樹脂としては例えば、α-アミノ酸と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の本発明の前駆体タンパク質を取得する。

本発明の前駆体タンパク質としては、上記した配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該本発明のポリペプチド質と同様の作用、例えば中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能

調節作用または感覺器官機能調節作用などを前駆体タンパク質自身が有しているものであつてもよい。

本発明の前駆体タンパク質はさらに該前駆体タンパク質に対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのタンパク質は上記した本発明の前駆体タンパク質の他に、上記本発明の前駆体タンパク質のN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドの塩としては、前述の本発明のボリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドまたはそのアミド、エスチルもしくはその塩は、上記した前駆体タンパク質の場合と同様の合成法に従つて、あるいは本発明の前駆体タンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによつて製造することができる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであつてもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブ

ライバー、前記した組織・細胞由來のcDNA、前記した組織・細胞由來のcDNAライブライバー、合成DNAのいずれでもよい。ライブライバーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであつてもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したもの用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT -PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

ここで、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列を有するDNAをコードするDNAなどがあげられる他

、配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同意性を有する塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

5 また、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、①配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列中の中1または2個以上(好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の塩基が欠失した塩基配列、②配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列中の中1または2個以上(好ましくは2個以上(好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の塩基が付加した塩基配列、③配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列中の1または2個以上(好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の塩基が挿入された塩基配列、④配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列中の1または2個以上(好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))の塩基が他の塩基で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせた塩基配列を有するDNAを含有するDNAなども含まれる。

10 より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを有するDNAの有する配列とハイブリダイズする補乳動物由來のDNA、(2)遺伝コードの縮量のため配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつタンパク質をコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方

法に従つて行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば42°C、5.0%ホルムアミド、4×SSPE (1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート浴液、0.1%SDSである。

5 配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイスするDNAとしては、例えば、配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同志性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10 また、本発明の配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとして好ましく用いられる。

15 本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAは上記した本発明のポリペプチドと同様にして遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAまたは本発明の前駆体タンパク質は、①本発明の前駆体タンパク質（または本発明のポリペプチド）の有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③本発明のポリペプチドをコードするDNAの入手、④組換型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RN A、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覺器官機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

20 特に、後述の組換型SEN Rの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSEN Rアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾患の予防・治療剤などとして使用することができます。

さらに、上記⑦に關し、本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神經系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覺器官系などで発現しているSEN Rがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覺器官調節作用などに作用するこことから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、バーキンソン病、ビック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、離脱、嗅覚異常、視覚異常などの疾患の治療・予防剤として用いることができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従つて実施することができる。例えば、必要に応じて拘束衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた薬業施に要求される単位用重量によって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用重量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、上記の添加剤と同様のものを用いることができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えは、D-ソルビトール、D-マニニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロビングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80 (TN)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油など

があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無毒化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重6.0kgとして）においては、一日につき約0.1から1.0mg、好ましくは約1.0から5.0mg、より好ましくは約1.0から2.0mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の心不全患者（体重6.0kgとして）への投与においては、一日につき約0.1から3.0mg程度、好ましくは約0.1から2.0mg程度、より好ましくは約0.1から1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、6.0kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質、該ポリペプチドまたは前駆体タンパク質をコードするDNAおよび抗体などの用途について、以下に具体的に説明する。

(1) ポリペプチド欠乏症の予防・治療剤

SEN Rに対する本発明のポリペプチドをコードするDNAをポリペプチドまたはSEN R欠乏症の予防・治療剤としても使用することができます。

例えば、生体内において、本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはSEN Rが減少しているためにリガンドの生理作用（中枢神経機能調節作用

用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覺器官機能調節作用など）が期待できない患者がいる場合に、(1) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによつて、あるいは(2) 脳細胞などに本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することによつて、該患者の脳細胞におけるポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の量を増加させ、(3) ペプチドまたはその前駆体タンパク質的作用を充分に発揮させることによる。したがつて、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性なポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

上記DNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはヒトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質もしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを医薬として使用する場合と同様の手段に従つて実施することができる。

(2) ポリペプチドに対するSEN Rの定量法

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質はSEN Rまたはその塩や該セプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有しているので、生体内におけるSEN Rもしくはその塩、またはSEN Rのペプチドまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。

この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と接触させることによつて被検体中のSEN Rもしくはその塩、またはSEN Rの部分ペプチドもしくはその塩の濃度を測定することができる。

具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従つて用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛輔「続ラジオムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)
(3) SENRと、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を接触させた場合における、例えば該SENRまたは該SENRの部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

5 グ方法
SENRまたはその塩や該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換型SENRの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、SENRを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(即ちSENRアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ちSENRアンタゴニスト)などが含まれる。「リガンドとの結合性を変化させる」とは、リガンドとの結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、(i) SENRもしくはその塩または該SENRの部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を接触させた場合と(ii) 上記したSENRもしくはその塩または該SENRの部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と上記したSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記したSENRまたは該SENRの部分ペプチドに、本発明のポリペプチドまたは該SENRまたは該SENRを接触させた場合と(ii) 上記したSENRまたは該SENRの部分ペプチ

ドに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を接触させた場合における、例えば該SENRまたは該SENRの部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、上記したSENRもしくはその塩またはその前駆体タンパク質またはその塩に接触した場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物をSENRもしくはその塩またはSENRの部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該SENRもしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、SENRを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物をSENRを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、SENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物をSENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該SENRに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物

物またはその塩のスクリーニング方法。

④SEN Rを活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質）をSEN Rを含有する細胞に接触させた場合と、SEN Rを活性化する化合物および試験化合物をSEN Rを含有する細胞に接触させた場合における、SEN Rを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸產生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤SEN Rを活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質など）をSEN RをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSEN Rに接触させた場合と、SEN Rを活性化する化合物および試験化合物を、SEN RをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSEN Rに接触させた場合における、SEN Rを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸產生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

SEN Rを製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、SEN Rを含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えればよい。

SEN Rを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

SEN Rを含有する細胞としては、SEN Rを発現した宿主細胞をい。該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Poller-Elevjen型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやボリトロン（Kinematic社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。

細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上槽をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したSEN Rと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該SEN Rを含有する細胞や膜画分中のSEN Rの量は、1細胞当たり～10⁶分子であるのが好ましく、10⁵～10⁷分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（活性性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なSEN R画分と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が用いられる。SEN R画分としては、天然型のSEN R画分か、またはものとしては、組換え体を用いて大量発現させたSEN Rなどが適している。

それと同等の活性を有する組換型SEN R画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアノログ化合物などが用いられる。例えば^(³H)、^(¹⁴C)、^(³⁵S)などで標識されたりガンドなどを利用することができます。

具体的には、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずSEN Rを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のポリペプチドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチジン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01mL～1.0mLの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に 10^{-10} ～ 10^{-7} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で滤過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはアーカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B₀）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B₀-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を

変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、SEN Rを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知する。方法または市販の測定用キットを用いて測定することができます。具体的には、まずSEN Rを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うには前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP生成抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができます。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なSEN Rを発現した細胞が必要である。本発明のSEN Rを発現した細胞としては、前述の組換え型SEN R発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSEN Rとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、SEN Rまたはその塩、SEN Rの部分ペプチドまたはその塩、SEN Rを含有する細胞、あるいはSEN Rを含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液
Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清ア
ルブミン(シグマ社製)を加えたもの。

孔径0.45μmのフィルターで過濾滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用
時調製しても良い。

②SENR標品
SENRを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で維
持し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド
(³H)、(¹²⁵I)、(¹⁴C)、(³⁵S)などで標識したリガンド
適当な浴媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し
、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

④リガンド標標準液
本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を0.1%ウシ血清アル
ブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で
保存する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したSENRを発現させた細胞を、測定
用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える
。

②10⁻³～10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識した本発明の
ペプチドまたはその前駆体タンパク質を5μl加え、室温にて1時間反応させ
る。非特異的結合量を知るために試験化合物のかわりに10⁻³Mのリガンド
を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標
識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレ
ーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測
定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式(数1)で求める。

[数1]

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得
る化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク
とSENRとの結合を変化させる(結合を阻害あるいは促進する)化合物であ
り、具体的にはSENRを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(い
わゆるSENRアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物(いわ
ゆるSENRアンタゴニスト)である。該化合物としては、ペプチド、タンパ
ク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化
合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。
上記SENRアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方
法は以下の(i)または(ii)に従えればよい。

(i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバイオインディング・アッセイ
を行い、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結
合性を変化させる(時に、結合を阻害する)化合物を得た後、該化合物が上記
したSENRを介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激
活性を有する化合物またはその塩はSENRアゴニストであり、該活性を
ない化合物またはその塩はSENRアンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させ、上記SENRを介
した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を測定する化合物またはその塩は
ENRアゴニストである。

(b) SE NRを活性化する化合物(例えば、本発明のポリペプチド、その前駆体
タンパク質またはSE NRアゴニストなど)をSE NRを含有する細胞に接触
させた場合と、SE NRを活性化する化合物および試験化合物をSE NRを含
有する細胞に接触させた場合における、SE NRを介した細胞刺激活性を測定

し、比較する。SENRを活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はSENRアンゴニストである。

該SENRアンゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、SENRアンゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覺器官調節作用などに関与していることから、SENRアゴニストは、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、バーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えは、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えは、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えはナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えはトリメチルアミン、トリエチルアミン、ビリジン、ピコリン、2-, 6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N-, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩があげられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えは塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸

などの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えは甘酸、酢酸、プロピオニ酸、フマル酸、シユウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えはアルギニン、リジン、オルチニンなどの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えはアスパラギン酸、グルタミン酸などの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

(4) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体または抗血清の製造

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体（例えは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えは、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

20 [ポリクローナル抗体の作製]

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがつて製造することができます。例えは、免疫抗原（ポリペプチド等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、後述のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物（例えは、哺乳動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するためには用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合

体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハブテン（本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド）との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハブテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアン等を重量比でハブテン1に対し約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカクルさせ方針が用いられる。

また、ハブテンとキャリアーのカプリングには、種々の締合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる締合生成物は、上記温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常約2～6週毎に1回ずつ、計3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取される。

抗血清中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体の測定は、後述のハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、後述のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従つて行なうことができる。

また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従つて製造することができる。
〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は、温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希

积剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された上記の温血動物、たとえばマウスなどから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日に脾臓またはリンパ節を探取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリド細胞を調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化した本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケラーテミルスタイル（ネイチャー（Nature）、256、495（1975））等に従い実施できる。融合促進剤としてはボリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としてはたとえばINS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG6000～PEG6000）が1.0～8.0%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体産生ハイブリド細胞には種々の方法が使用できるが、たとえば本発明のポリペプチド抗原またはその前駆体タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添

加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のポリペプチドを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従つて行なうことができるのである。通常HAT（ヒボキサンチン、アミノブチリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別おおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGJT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の本発明のポリペプチドに対する抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固定あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従つて行われる。

上記の(a)および(b)の方法に従つて製造させる本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体は、それぞれ本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、例えば、

- (i) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と、
被検液および標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と
を競合的に反応させ、該抗体に結合した標識した本発明のポリペプチドまたは
その前駆体タンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明
のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法、
- (ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時に
は連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを
特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の
定量法において、一方の抗体が、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タン
パク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたは
その前駆体タンパク質のC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検
液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法を提供する。
本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を認識するモノクローナ
ル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定を行
なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には
、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab') 、 $F(ab') 、
あるいは $F(ab)$ 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に
制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばポリペプチド
に対する抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的
段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線
より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフ
ロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用い
られるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好
ましい。$$

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵
素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば
（ ^{125}I ）、（ ^{131}I ）、（ 3H ）（ ^{14}C ）などが、上記酵素としては、安定
で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、β-グルコ

シダーゼ、アルカリフォスファターゼ、バーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれ等が用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビシン系を用いることもできる。

5 抗原あるいは抗体の不溶化に当つては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリラミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

10 サンドイッチ法においては不溶化した抗ポリペプチド抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗ポリペプチド抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行つても、また、同時になつてもよいし時間をずらして行なつてもよい。

15 標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はない、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてよい。

20 本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質抗体は本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端部以外、例えばN末端部を認識する抗体が用いられる。

25 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネット

フロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体にに対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの濃度を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体内に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる相化法とが用いられる。

5 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

10 また、ネロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にはもレーザーの散乱を利用するレーザーネロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたつては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それ、その方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドの測定系を構築すればよ。これら的一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical

Techniques (Part C)、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part 1: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。	5	5	C	：シトシン
以上のように、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を感度良く定量することができる。	10	10	Y	：チミンまたはシトシン
被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を定量するごとに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患を診断することができる。本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患としては、例えば、老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、バーキンソン病、ビック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾患があげられる。被検液は被検哺乳動物（例、ヒト、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）から自体公知の方法によって調製できる。被検液としては、例えば、血液、リンパ液、尿などが挙げられる。	15	15	C	：チミン、シトシン、アデニン、アデニンまたはグアニン
本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に關し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。	20	20	T	：シトシン
DNA : デオキシリボ核酸	25	25	A	：アデニン
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸	A	C	：システィン	
A : アデニン	T	M	：メチオニン	
T : チミン	G	E	：グルタミン酸	
G : グアニン	G	D	：アスパラギン酸	

Lys またはK : リジン
 Arg またはR : アルギニン
 His またはH : ヒスチジン
 Phe またはF : フェニルアラニン
 5 Tyr またはY : チロシン
 Trp またはW : ドリプロトファン
 Pro またはP : プロリン
 Asn またはN : アスパラギン
 Glu またはQ : グルタミン
 10 Phe またはY : ピログルタミン酸
 Me : メチル基
 Et : エチル基
 Bu : プチル基
 Ph : フェニル基
 15 Tc : チアソリジン-4 (R) -カルボキサミド基
 Boc : ベンジルオキシメチル
 NMP : N-メチルビロリドン
 PAM : フェニルアセトアミドメチル

また、本明細書中で繰用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

20 Tos : p-トルエンスルfonyl
 HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2、3-ジカルボキシイミド
 Bz 1 : ベンジル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 25 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 Boc : t-ブチルオキシカルボニル
 HOEt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

DCC : N、N'-ジシクロヘキシカルボジイミド
 TFA : トリフルオロ酢酸
 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 DNP : ジニトロフェニル
 5 Bum : ターシャリーブトキシメチル
 Trt : トリチル
 MeBz 1 : 4-メチルベンジル
 CHO:ホルミル
 NMP : N-メチルビロリドン
 10 本明細書の配列番号は、以下の配列を示す。
 (配列番号：1)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの部分配列
 を取得するのに使用した合成DNAを示す。
 (配列番号：2)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの部分配列
 を取得するのに使用した合成DNAを示す。
 (配列番号：3)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質の一部をコードするcDNAの塩基配列を示す。
 15 (配列番号：4)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの5'側部分
 配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。
 (配列番号：5)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの5'側部分
 配列を取得するためのRACE-PCRに使用した合成DNAを示す。
 25 (配列番号：6)
 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの5'側部分
 配列の塩基配列を示す。
 (配列番号：7)

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するための RACE-PCR に使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 8]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するために放射標識プローブとして使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 9]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列の塩基配列を示す。

[配列番号 : 10]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 11]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 12]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の全塩基配列を示す。

[配列番号 : 13]

ラット urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 14]

ラット urotoxin II like peptide-1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 15]

ラット urotoxin II like peptide-2 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 16]

配列番号 14 (ラット urotoxin II like peptide-1) の DNA 配列を示す。

[配列番号 : 17]

配列番号 15 (ラット urotoxin II like peptide-2) の DNA 配列を示す。

[配列番号 : 18]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 19]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 20]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を示す。

[配列番号 : 21]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 22]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列および全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 23]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を示す。

[配列番号 : 24]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

[配列番号 : 25]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を示す。

[配列番号 : 26]

マウス urotoxin II like peptide 前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 27]

マウス urotoxin II like peptide のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 28]

配列番号 27 (マウス urotoxin II like peptide) の DNA 配列を示す。

[配列番号 : 29]

ラット SERP 蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 30]

ヒト SENR 蛋白質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：31)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるラット urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：32)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるマウス urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：33)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるマウス urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：34)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるマウス urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：35)

配列番号：31 (ラット urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：36)

配列番号：32 (ラット urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：37)

配列番号：33 (マウス urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：38)

配列番号：34 (マウス urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

後述の実施例 3 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* XL10-Gold/pCRT-*rlu* like は、平成 11 年 6 月 2 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERN BP-6740 として、日本国大阪市淀川

区十三本町 2 丁目 17 番 85 号 (郵便番号 532-8686) の財團法人発酵研究所 (IFO) に平成 11 年 4 月 18 日から寄託番号 IFO 16285 として寄託されている。

5 [配列番号：32]

実施例 以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

参考例 1 ヒト脳由来 cDNA を用いた PCR 法によるヒト SENR (=GPR14) 受容体 cDNA の增幅

ヒト脳由来 poly (A)⁺ RNA (クロントック社) を錆型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なう。逆転写反応は、タカラ RNA PCR ver. 2 キット

の試薬を使用する。次にこの逆転写生成物を錆型として用い、配列番号 23 および 24 の合成 DNA プライマーを用いて PCR 法による增幅を行なう。合成 DNA プライマーは受容体蛋白質由来の塩基配列が增幅されるよう構造するが、

その際に遺伝子の 5' 側に制限酵素 *Sal* I の認識する塩基配列が付加され、また 3' 側に制限酵素 *Spe* I の認識する塩基配列が付加されるよう、5' 側および 3'

側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加する。反応液の組成は、cDNA 錆型 5 μl、合成 DNA プライマー各 1 μM、0.2 mM dNTPs、1 mM MgCl₂、100 μg DNA ポリメラーゼ 1 μl および酵素に付属のバッファーで、総反応量は 50 μl とする。

増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (バーキンエルマー社) を用いる。増幅のサイクルは 94°C・60 秒の加熱の後、94°C・30 秒、59°C・30 秒、74°C・60 秒のサイクルを 35 回繰り返す。增幅産物の確認は、0.8% アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムプロマイド染色によって行なう。

25

参考例 2 PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解説による增幅 cDNA 配列の確認

参考例 1 で行なう PCR 後の反応産物は 0.8% の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フ

エノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収する。PCR-Script™ Amp SK(+)クローニングキット（ストラタジーン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターPCR-Script Amp SK(+)へサブクローニングする。これをエシエリヒアコリ (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換した後、cDNA導入断片を持つクローンをアンビシンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* JM109/SENRを得る。個々のクローンをアンビシンを含むLB培地で一晩培養し、QIA prep® mini prep (キヤゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製する。調製したDNAの一部を用いて制限酵素 *Sal* IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認する。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (バーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読する。得られたクローンの配列を解析し、全ての配列が報告されているヒトGPR14 (*<SEN>*遺伝子 (EP 0 859 052 A1) の配列の5'側に *Sal* I認識配列が附加し、3'側に *Spe* I認識配列が附加した遺伝子配列と一致することを確認する。

参考例3 ヒトSEN R発現CHO細胞の作製

参考例2で配列が確認されるヒト脳由来のSEN Rの全長アミノ酸配列をコードする5'側に *Sal* I認識配列が附加し、また3'側に *Spe* I認識配列を附加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンよりPlasmid Midi Kit (キヤゲン社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素 *Sal* Iおよび *Spe* Iで切断してインサート部分を切り出す。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出・フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収する。このインサートDNAを *Sal* Iおよび *Spe* Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミド pAKKO-11H (Hinuma, S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994)記載の pAKKO-11H と同一のベクタープラスミド) に加え、14ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現プラスミ

ド pAKKO-hSEN Rを構築する。

pAKKO-hSEN Rで形質転換した *E. coli* DH5 (トーヨーポー) を培養後、Plasmid Midi Kit (キヤゲン社) を用いてpAKKO-SEN RのプラスミドDNAを調製する。これをCellPhect Transfection Kit (アマシャムファルマシアイオテク社) を用いて添付のプロトコルに従ってCHO dhfr細胞に導入する。10 mgのDNAをリン酸5'ルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 × 10⁶または1 × 10⁶個のCHO dhfr細胞を播種した10 cmシャーレに添加する。10%胎児血清を含むMEMa培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEMa培地で培養する。選択培地中で増殖してくるヒトSEN R発現CHO細胞である形質転換細胞 (CHO/hSEN R) のコロニーを選択する。

参考例4 ラット脳由来cDNAを用いたPCR法によるラットSEN R (GPR14)受容体cDNAの増幅

ラット脳由来poly (A) +RNA (クローンテック社) を鋸型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応は、タカラRNA PCR ver. 2キットの試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋸型として用い、配列番号1および2の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成DNAプライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素 *Sal* Iの認識する塩基配列が附加され、また3'側に制限酵素 *Spe* Iの認識する塩基配列が附加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を附加した。反応液の組成は、cDNA鋸型5 μl、合成DNAプライマー各1 μM、0.2 mM dNTPs、1 mM MgCl₂、KOD (King of DNA) DNAポリメラーゼ1 μlおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (バーキンエルマー社) を用い、94°C・60秒の加熱の後、94°C・30秒、59°C・30秒、74°C・60秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムプロマイド染色によって行なった。

参考例5 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入

cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

参考例4で行なったPCR後の反応物は0.8%の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このPCR-Script™ Amp SK (+)クローニングキット（ストラタジーン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK (+)へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを挑出した。つま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* JM109/SENRを得た。個々のクローンをアンピシンを含むLB培地で一晩培養し、QIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製した。調整したDNAの一部を用いて制限酵素 *Sal* I および *Spe* Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた3クローンの配列を解析し全ての配列が報告されているSENR (sensory epithelial neuropeptide-like receptor) のDNA配列 (Tal, M. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 209, pp. 752-759 (1995)) の5'側に *Sal* I認識配列が付加し、3'側に *Spe* I認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認した。なお、報告されているGPR14遺伝子の配列 (Marchese, A. et al. *Genomics*, vol. 29, pp. 335-344 (1995)) では開始コードであるATGのAを1番目としたとき945番目がCであるが、SENRの配列および上記で決定した配列ではCである。

参考例5で配列が確認されたラット脳由来のSENRの全长アミノ酸配列をコードし5'側に *Sal* I認識配列が付加し、また3'側に *Spe* I認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンより Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素 *Sal* I

および *Spe* Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このインサートDNAを *Sal* Iおよび *Spe* Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドPAKKO-111H (Hinuma, S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載のPAKKO1, 11Hと同一のベクタープラスミド) に加え、T4ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドPAKKO-SENRを構築した。

PAKKO-SENRで形質転換した *E. coli* DH5 (トーヨーボー) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてpAKKO-SENRのプラスミドDNAを調製した。これをCellPfect Transfection Kit (アマシャムファルマシバイオテク社) を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr細胞に導入した。10 μgのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 × 10⁴または1 × 10⁵個のCHO dhfr細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α培地で1日間培養した後、経代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α培地で培養した。選択培地中で増殖してくるSENR発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー68クローンを選択した。

実施例1 ラット脊髄cDNAの調製

10 *Sal* Iおよび *Spe* Iを用いてpoly (A) RNAを調製した。この(A) RNAからThermoScript逆転写酵素 (キブコ BRL社) を用い、マニユアルにて3'-RACEアターフライマー (GGCACCCTGACTAGTAC(T)₁₁ : キブコ BRL社) をプライマーに用いて50°Cで逆転写を行ない、一本鎖ラット脊髄cDNAを作成した。また、同様にマニユアルにしたがってThermoScript逆転写酵素 (キブコ BRL社) を用い、random hexamerを用いて同じ poly (A) RNAから50°Cで逆転写したcDNAをMarathon cDNA amplification kit (クロントック社) のマニユアルにしたがって第二ストランドを合成して二本鎖cDNAとし、キットに付属のMarathon cDNAアダプター配列の付加を行なった。

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

実施例2 PCR法によるラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNAの部分配列の決定

ヒトurotensin II前駆体蛋白質をコードする塩基配列(GenBank accession No. AF104118)の開始コドンにあたるATGから265-287番目の塩基配列および352-375番目の塩基配列にそれぞれに基づいて作製した配列番号:1および2のプライマー(日本バイオサービスに合成委託)を行い、ラット腎臓より実施例1で得られた一本鎖cDNAを鋤型としてPCR反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに2.5 μ Mとし、2.5 mM MgCl₂、dNTP 0.2 mM, AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社) 1/200 volume、10 倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume、波盤は25 μ lとした。PCRの条件は、95°Cで9分間保温した後、94°C・20秒、60°C・15秒、80°C・20秒のサイクルを3回、94°C・20秒、58°C・15秒、80°C・20秒のサイクルを5回、94°C・20秒、65°C・15秒、80°C・20秒のサイクルを7回、94°C・20秒、53°C・15秒、80°C・20秒のサイクルを30回繰り返した。PCR反応液を3.5% NuSieve GTG Agarose(宝酒造)を用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドによる染色によって検出される110 bp付近のバンドからGeneClean Spin kit(ハイオ101社)によってDNAを抽出した。これをTOP10 TA cloning kit(インビトロジエン社)を用いてプラスミドベクターpCR IIにサブクローニングし、大腸菌XL10-Gold(ストラタジーン社)に導入した。生じた形質転換体からQIA prep 8 mini prep kit(キヤン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit(パーキンエルマー社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号:3に示す塩基配列が得られた。この配列はヒトurotensin II前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に相同性が認められ、urotensin IIに類似したペプチドの前駆体蛋白質をコードしていることが示唆された。しかし、別にラット染色体配列から決定したラットurotensin II(ラットSENR ligand)前駆体蛋白質遺伝子の部分配列(WO 00/32627に記載)とは異なっていた。そこで、この配列はラットurotensin IIの前駆体蛋白質ではなく、これは別なラットurotensin II類似のペプチドの前駆体蛋白質をコード

するcDNAの部分配列であると結論された。このラットurotensin IIに類似したペプチドをラットurotensin II like peptideと命名した。

実施例3 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によるラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNA配列の決定

5 ラットurotensin II like peptide前駆体蛋白質をコードするcDNA配列の決定端側の配列を決定するため、実施例1で得た二本鎖cDNA調製液をMarathon cDNA amplification kit(クロントック社)の指示どおり25倍希釈して2.5 μ lを鋤型にし、配列番号:4(日本バイオサービスに合成委託)のプライマーおよびキットに付属のアダプターブライマーAPIを用いてPCRを行なつた。反応液の組成は、プライマー濃度を配列番号:4を0.4 μ M、APIを0.2 μ M、dNTP 0.2 mM, AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社) 1/100 volume、10 倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume、波盤は25 μ lとした。PCRの条件は、95°Cで9分保温した後、94°C・20秒、68°C・1分のサイクルを3回、94°C・20秒、65°C・1分のサイクルを25回、繰り返した。この反応液1 μ lを錫型にし、配列番号:5(日本バイオサービスに合成委託)のプライマーおよびキットに付属のアダプターブライマーAPI2を用いて再度PCRを行なつた。反応液の組成は、プライマー濃度を配列番号:5を0.4 μ M、API2を0.2 μ M、dNTP 0.2 mM, AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社) 1/100 volume、10 倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume、波盤は25 μ lとした。PCRの条件は、95°Cで9分保温した後、72°C・7分保温した。PCR 20秒、64°C・30秒のサイクルを35回繰り返した後、72°C・7分保温した。PCR反応液を3.5% NuSieve GTG Agarose(宝酒造)を用いて電気泳動して、エチジウムプロマイドによる染色によって検出される420 bp付近のバンドからGeneClean Spin kit(ハイオ101社)によってDNAを抽出し、TOP10 TA cloning kit(インビトロジエン社)を用いてプラスミドベクターpCR IIにサブクローニングし、大腸菌XL10-Gold(ストラタジーン社)に導入した。生じた形質転換体からQIA prep 8 mini prep kit(キヤン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit(パーキンエルマー社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号:3に示す塩基配列が得られた。この配列はヒトurotensin II前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に相同性が認められ、urotensin IIに類似したペプチドの前駆体蛋白質をコードしていることが示唆された。しかし、別にラット染色体配列から決定したラットurotensin II(ラットSENR ligand)前駆体蛋白質遺伝子の部分配列(WO 00/32627に記載)とは異なっていた。そこで、この配列はラットurotensin IIの前駆体蛋白質ではなく、これは別なラットurotensin II類似のペプチドの前駆体蛋白質をコード

解読したところ、配列番号：6 に示す配列が得られた。この配列にはラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コドンを含む 5' 末端側の配列が含まれていた。

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3' 末端側の配列を決定するため、実施例 1 で調製したラット脊髄由来一本鎖 cDNA 50 ng を鋸型にし、配列番号：7 (日本バイオサービスに合成委託) のプライマーおよび Abridged Universal Amplification Primer (ギブコ BRL 社) を用いて PCR を行った。反応液量は 50 μ l で反応液の組成は、プライマー濃度を 0.2 μ M とし、dNTP 0.2 mM, Advantage2 (クロントック社) 1/50 volume, 10 倍濃縮 Advantage2 Buffer 1/10 volume を 25 μ l とした。PCR の条件は、94°C・30 秒、57°C・30 秒、57°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 30 回繰り返した後、72°C で 10 分保温した。

PCR 反応液を 0.2 μ N とし、dNTP 0.2 mM, Advantage2 (クロントック社) 1/50 volume, 10 倍濃縮 Advantage2 Buffer 1/10 volume を用いて電気泳動し、サイバーグリーン (ニッポンジーン社) による染色によって検出される 450 bp 付近のバンドから QIAGEN Gel Extraction kit (キヤゲン社) によって DNA を抽出して TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてサブクローニングを行なった。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キヤゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号：12 に示す配列が得られた。この配列にはラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コドンと終止コドンを含む全長配列が含まれていた。このラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA が導入された plasmid pcrII-rU11 like で大腸菌 XL10-Gold (ストラタジーン社) を形質転換して大腸菌 XL10-Gold/pcrII-rU11 like を得た。

配列番号：12 の塩基配列から翻訳されるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：13 として示した。また、図 1 にラット urotensin II like peptide 前駆体の DNA 配列および対応するアミノ酸配列を示した。この前駆体蛋白質配列から予想される成熟ペプチドである urotensin II like peptide は、染色体配列から予想された 12 残基のアミノ酸からなるラット urotensin II とは異なり、成熟ペプチドを切り出す切断部位が 5 残基または 2 残基 3' 末端側にあるため 17 残基または 14 残基であると推定された。17 残基の配列である配列番号：9 が得られた。

からなる urovensin II like peptide をラット urovensin II like peptide-1、また 14 残基からなる urovensin II like peptide をラット urovensin II like peptide-2 とよぶ。また、予想される成熟ペプチドの N 末端がグルタミンであるため実際のペプチドの N 末端はピログルタミン酸であると考えられた。配列番号 : 14 および 15 に予想されるラット urovensin II like peptide-1 および -2 の配列を示した。ただし、ここで想定した成熟ペプチドの切断部位は非典型的であることから、前駆体蛋白のアミノ酸配列の 103 番目あるいは 99 番目の Arg 残基を切断部位とした場合は、さらに N 末の長い 20 残基からなる配列番号 : 31 に示す配列または 24 残基からなる配列番号 : 32 に示す配列が成熟ペプチドの構造として考えられる。

実施例 4 マウス脊髄 cDNA の調製

マウス脊髄より Isogen kit (ニッポンジーン社) を用いて total RNA を調製後、Oligotex (dT)₃₀ (宝酒造) を用いて poly (A) 'RNA 部分を調製した。この poly (A) 'RNA から ThermoScript 逆転写酵素 (ギブコ BRL 社) を用い、マニユアルにしだがつて oligo dT プライマーを用いて 60°C で逆転写を行なってマウス脊髄 cDNA を作製した。

実施例 5 PCR 法によるマウス urovensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の部分配列の決定

マウス urovensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5' 未端側の配列を決定するためにラット urovensin II like peptide 前駆体蛋白質の 5' 未端側非翻訳領域の開始コドンの上流 14 塩基から 35 塩基の配列に相当するプライマー (配列番号 : 16) およびラット urovensin II like peptide の C 未端領域を参考に作成したプライマー (配列番号 : 19) を用い、実施例 4 で逆転写したマウス脊髄 cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を酵型とし、PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度とともに 0.4 μ M とし、dNTP 0.2 mM、ExTaq (宝酒造) 1/50 volume、10 倍濃縮 ExTaq Buffer 1/10 volume、液量は 20 μ l とした。PCR の条件は、95°C で 1 分間保温した後、72°C で 7 分間保温し、47°C・15 秒、72°C・30 秒のサイクルを 9 分間保温した後、95°C・10 秒、57°C・15 秒、72°C・30 秒のサイクルを 5 回、95°C・10 秒、54°C・15 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、72°C で 7 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% NuSieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドによる染色によって検出される 420 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミド pCR2.1 にサブクローンングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequencing kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号 : 20 に示す塩基配列が得られた。この配列はラット urovensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に高い相同意識が認められ、マウス urovensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の 5' 末端側部分配列であると考えられた。

5 また、マウス urovensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3' 未端側の配列を決定するためにラット urovensin II like peptide 前駆体蛋白質の Gly¹⁹Arg²⁰ 領域を参考に作成したプライマー (配列番号 : 21) およびラット urovensin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の 3' 未端側非翻訳領域の終止ニドンの下流 22 塩基から 43 塩基の配列に相当するプライマー (配列番号 : 22) を用い、実施例 4 で逆転写した cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を酵型とし、PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度とともに 0.4 μ M とし、dNTP 0.2 mM、ExTaq (宝酒造) 1/50 volume、10 倍濃縮 ExTaq Buffer 1/10 volume、液量は 20 μ l とした。PCR の条件は、95°C で 1 分間保温した後、72°C で 7 分間保温し、47°C・15 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、72°C で 7 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% NuSieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドによる染色によって検出される 170 bp 付近のバンドから Mermaid Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクター pcr2.1 にサブクローンングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8

mini prep kit (キヤゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequence kit (バーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号 : 23 に示す塩基配列が得られた。この配列は、上に得られた配列番号 : 20 と約 50 塩基に亘って一致し、またラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に高い相同性が認められたのでマウス urotenin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の 3'末端側部分配列であると考えられた。

実施例 6 PCR 法によるマウス urotenin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列の取得

上に述べたようにして得られた 5'末端側および 3'末端側の配列情報から予想されるマウス urotenin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長を含む配列を得るため、配列番号 : 24 および実施例 5 に記載の 3'末端側部分配列を取得するのに用いた配列番号 : 22 のプライマーを用い、実施例 4 で逆転写したマウス脊髄 cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を鋤型として PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0.4 μ M とし、dNTP 0.2 mM、ExTaq (宝酒造) 1/50 volume、10 倍濃縮 ExTaq Buffer 1/10 volume、液量は 20 μ l とした。PCR の条件は、94°C で 2 分間保温した後、95°C・10 秒、47°C・15 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、72°C で 10 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドによる染色によって検出される 430 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクター pcr2.1 にサブクローニングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キヤゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequence kit (バーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号 : 25 に示す配列が得られた。この配列にはマウス urotenin II like peptide

前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コードンと終止コードンを含む全長配列が含まれていた。このマウス urotenin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA が導入された plasmid pcr2.1-mJLP で大腸菌 TOP10 (インビトロジェン社) を形質転換して大腸菌 XL10-Gold/pcr2.1-mJLP を得た。

配列番号 : 25 の塩基配列から翻訳されるラット urotenin II like peptide 前駆体蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 : 26 として示した。また、図 2 にマウス urotenin II like peptide 前駆体の DNA 配列および対応するアミノ酸配列を示した。この前駆体蛋白質配列から予想される成熟ペプチドであるマウス urotenin II like peptide は、ラット urotenin II like peptide-1 と同様に 17 残基であると推定された。また、予想される成熟ペプチドの N 末端がグルタミンであるため実際のペプチドの N 末端はピログルタミン酸であると考えられた。配列番号 : 27 に予想されるマウス urotenin II like peptide の配列を示した。

ただし、ラットの場合と同様、ここで想定した成熟ペプチドの切断部位は非典型的であることから、前駆体蛋白のアミノ酸配列の 103 番目あるいは 99 番目の Arg 残基を切断部位とした場合は、さらに N 末端の長い 20 残基からなる配列番号 : 33 に示す配列または 24 残基からなる配列番号 : 34 に示す配列が成熟ペプチドの構造として考えられる。

実施例 7 ラット urotenin II like peptide-1 : pGlu-Arg-Lys-Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-11e-0H (配列番号 : 14) の製市販 Boc-11e-0CH₂-PAM樹脂 (0.746 m mole/g resin) 0.5 m mole 分をヘテド合成機 ABI 430A の反応槽に入り、Boc-strategy (NMP-HOBt) ベブチド合成方法で Boc-Cys (MeBz1)、Boc-Tyr (Br-2)、Boc-Lys (Cl-2)、Boc-Trp (CH0)、Boc-Phc、Boc-Cys (MeBz1)、Boc-Glu (0cHex)、Boc-Pro、Boc-Ala、Boc-Thr (Bz1)、Boc-Gly、Boc-His (Bom)、Boc-Gln、Boc-Lys (Cl-2)、Boc-Arg (Tos)、2-pGlu を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂を D-クレゾール、1,4-ブタンジオールと共に無水弗化水素中、0°C 60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物ヘジエチルエーテルを加え沈殿を通過した。この沈殿に 5

0 % 酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50 % 酢酸水で充填したセファデックス™ G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め LiChroprep™ RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1 % TFA 水 200ml で洗浄、0.1 % TFA 水 300ml と 0.1 % TFA 含有 40 % アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮した。此れを 2 % 酢酸水に 5×10^{-3} モル/l 程度の濃度で溶解し、アンモニア水を用い pH 7.5 に調整後、緩やかに空気を吹込み脱气した。反応を HPLC で追跡し、SH 体ペプチドのビーコーがすべてジスルフィド体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液の pH を 3 に調整し、上記 LiChroprep™ RP-18 カラムに吸着した。カラムを 0.1 % TFA 水 200ml で洗浄後、0.1 % TFA 水 300ml と 0.1 % TFA 含有 50 % アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め、凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による ($M+H$)⁺ 2076.12 (計算値 2075.96)

HPLC 溶出時間 18. 3 分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A 液—0.1 % TFA 水、B 液—0.1 % TFA 含有アセトニトリルを用い A/B : 95/5~45/55 へ直線型濃度勾配溶出 (2.5 分)

流速：1.0 ml / 分

20

実施例 8 ラット urotensin II like peptide-1 : Gln-Arg-Lys-Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH (配列番号 : 14) の製造前記製造実施例 7 の L-pGlu を Boc-Gln に変更し、同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を 1/100N-HCl に溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による ($M+H$)⁺ 2093.20 (計算値 2092.99)

HPLC 溶出時間 17. 8 分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A 液—0.1 % TFA 水、B 液—0.1 % TFA 含有アセトニトリルを用い A/B : 95/5~45/55 へ直線型濃度勾配溶出 (2.5 分)

流速：1.0 ml / 分

実施例 9 ラット urotensin II like peptide-2 : pGlu-His-Gly-Thr-Ala-pGlu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH (配列番号 : 15) の製造

市販 Boc-Ile-OC₂H₅-PAM 樹脂 (0.746 mmole/g resin) 0.5 mmole 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Cys (MeBz), Boc-Tyr (Br-Z), Boc-Lys (Cl-Z), Boc-Trp (CHO), Boc-Phc, Boc-Cys (MeBz), Boc-Glu (OcHex), Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Thr (BzI), Boc-Gly, Boc-His (Bom), 2-pGlu を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.45 g を D-クレゾール、1,4-ブタンジオールと共に無水沸化水素中、0 ℃、60 分攪拌した後、沸化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を通過した。この状態に 50 % 酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50 % 酢酸水で充填したセファデックス (商品名) G-25 カラム RP-18 を充填した逆相クロマカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1 % TFA 水 200 ml で洗浄、0.1 % TFA 水 300 ml と 0.1 % TFA 含有 40 % アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮した。これを約 4 ml の酢酸に

溶解、蒸留水で 240 ml に希釈の後、アンモニア水を用い pH 7.5 に調整し、上

やかに空気を吹込み攪拌した。反応を HPLC で追跡し、SH 体ペプチドのビーグルがすべて SS 体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液の pH を 3 に調整し、上記 LiChroprep (商品名) RP-18 カラムで洗浄した。カラムを 0.1 % TFA 水 200 ml で洗浄後、0.1 % TFA 水 300 ml と 0.1 % TFA 含有 50 % アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め濃縮した。

25 質量分析による ($M+H$)⁺ 1664.1 (計算値 1663.7)

HPLC 溶出時間 19. 9 分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液－0.1% TFA水、B液－0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

実施例 1 0 ラット uro tensin II like peptide-2 : Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Lle-0H (配列番号：15) の製造
前記製造実施例9の固相ペプチド合成の7-dGluをBoc-Glnに変更し、同様に脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を1/100N-HClに溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1680.73 (計算値 1680.73)

HPLC 溶出時間 19. 3分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液－0.1% TFA水、B液－0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B：

95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（2.5分）

流速：1.0 ml / 分

流速：1.0 ml / 分

実施例 1 2 マウス uro tensin II like peptide : Gln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Lle (配列番号：27) の製造
実施例 8 に記載のラット uro tensin II like peptide-1 の製造中の Boc-Thr(BzI)をBoc-AlaにBoc-Arg(Tos)をBoc-His(Bom)に代え同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を1/100N-HClに溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 2044.07 (計算値 2043.93)

HPLC 溶出時間 18. 5分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液－0.1% TFA水、B液－0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B：

95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（2.5分）

流速：1.0 ml / 分

実施例 1 3 合成ラット uro tensin II like peptide-1 およびuro tensin II like peptide-2 の CHO/rSENR 細胞株に対するアラキドン酸代謝物促進活性
実施例 9 で合成したラット uro tensin II like peptide-2 (配列番号：15) が示すラット SENR 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方
法により測定した。

CHO/rSENR 細胞 (W00/32627 に記載の CHO/rSENR 細胞と同一の細胞) を
プレートに 5 x 10⁴ cell/well で播種し、24 時間培養後、[³H]アラキドン酸を
0.25 μ Ci/well となるよう添加した。[³H]アラキドン酸添加 16 時間後、細胞を
0.05% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むハンクス氏液 (HBSS) で洗浄し、各 well
に合成ラット uro tensin II like peptide を加えた 0.05% BSA 含有 HBSS 500 μ
l を添加した。37°Cで 30 分間インキュベートした後に、反応液 500 μ l から 350
 μ l をシンチレーターに加え、反応中に遊離された [³H]アラキドン酸代謝物の量
をシンチレーションカウンターにより測定した。その結果、ラット uro tensin II

流速：1.0 ml / 分

実施例 1 1 マウス uro tensin II like peptide : pGlu-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Lle (配列番号：27) の製造
実施例 7 に記載のラット uro tensin II like peptide-1 の製造中の Boc-Thr(BzI)をBoc-AlaにBoc-Arg(Tos)をBoc-His(Bom)に代え同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を1/100N-HClに溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 2027.11 (計算値 2026.91)

HPLC 溶出時間 18. 9分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液－0.1% TFA水、B液－0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B：

95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（2.5分）

流速：1.0 ml / 分

like peptide によってペプチドの濃度依存的にアラキドン酸代謝物の培地中への放出が確認された(図3)。このときのEC₅₀値は1.1 nMであった。また、同様の活性は、実施例7で合成したラットurotensin II like peptide-1(配列番号:14)を投与した場合にも確認された(EC₅₀値は1.7 nM)。さらに、同様の活性はマウスurotensin II like peptide(配列番号:27)を投与した場合にも確認される。また、ラットurotensin II like peptide-1および-2あるいはマウスurotensin II like peptideをヒトSENR発現CHO細胞(WO 00/32627)に記載のCHO/hSENR細胞)に対して投与した場合にも確認される。

収縮作用

実施例7で合成したラットurotensin II like peptide-1(配列番号:14)のラット胸部大動脈に対する作用を以下の方針により測定する。9-12週齢の雌性Wistar rat(日本チャールスリバーより購入)をネンプタール注射液(大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital、50 mg/kg 腹腔内投与)により麻酔し、腹部大動脈より全採取して失血死させる。このラットより胸部大動脈を幅5 mmのリング標本を作製する。標本を混合ガス(95% O₂-5% CO₂)を通じて37°Cに保温したKrebs-Henseleit溶液(NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glucose 10.0 mM) 3 mlを満たしたオーガンバス中に懸垂し、等尺性収縮張力を微小荷重変換器(UL-10GR、ミネベア社)を介してボリグラフ(NEC三栄社)で記録する。静止張力は約0.5 gとする。内皮の存在は、10⁻⁶ M norepinephrine投与によって惹起した収縮が10⁻⁴ M acetylcholine投与によって弛緩することを観察することによって確認する。ラットurotensin II like peptide-1は終濃度10⁻¹⁰ - 10⁻⁷ Mとなるよう累積投与する。ラット頸動脈標本はラットurotensin II like peptide-1の添加によって用量依存的に収縮する。また、同様の活性はラットurotensin II like peptide-2(配列番号:15)あるいはマウスurotensin II like peptide(配列番号:27)を投与した場合にも確認される。

実施例1.4 合成ラットurotensin II like peptide-1およびurotensin II like peptide-2の麻酔下ラットの血圧に対する作用

実施例9で合成したラットurotensin II like peptide-2(配列番号:15)の麻酔下ラットの血圧に対する作用を以下の方針により測定した。8-9週齢の雌性Wistar rat(日本チャールスリバーより購入)をネンプタール注射液(大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital、50 mg/kg 腹腔内投与)により麻酔し、トランステューサーに接続した血圧測定用カテーテル(SP-55)を左頸動脈に、静脈投与用カテーテル(SP-35)を左大腿動脈にそれぞれ挿入した。合成ラットurotensin II like peptide-2は0.05% BSAを含む生理的食塩水に溶解し、10 nM/kgとなるよう左大腿静脈より投与した。血圧は連続してボリグラフ(NEC三栄社)で記録した。ラットの血圧はペプチドの投与によって低下し、ラットurotensin II like peptide-2は降圧作用を示した。ラットurotensin II like peptide-2を10 nmol/kg投与したときの投与前の平均血圧に比べた低下血圧は約35 mmHgであった。また、同様の活性は、実施例7で合成したラットurotensin II like peptide-1(配列番号:14)を投与した場合にも確認された。ラットurotensin II like peptide-1を10 nmol/kg投与したときの投与前の平均血圧に比べた低下血圧は約33 mmHgであった。さらに、同様の活性はマウスurotensin II like peptide(配列番号:27)を投与した場合にも確認される。

実施例1.5 合成ラットurotensin II like peptide-1のラット頸動脈に対する

実施例7で合成したラットurotensin II like peptide-1(配列番号:14)のラット胸部大動脈に対する作用を以下の方針により測定する。9-12週齢の雌性Wistar rat(日本チャールスリバーより購入)をネンプタール注射液(大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital、50 mg/kg 腹腔内投与)により麻酔し、腹部大動脈より全採取して失血死させる。このラットより胸部大動脈を幅5 mmのリング標本を作製する。標本を混合ガス(95% O₂-5% CO₂)を通じて37°Cに保温したKrebs-Henseleit溶液(NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glucose 10.0 mM) 3 mlを満たしたオーガンバス中に懸垂し、等尺性収縮張力を微小荷重変換器(UL-10GR、ミネベア社)を介してボリグラフ(NEC三栄社)で記録する。静止張力は約0.5 gとする。内皮の存在は、10⁻⁶ M norepinephrine投与によって惹起した収縮が10⁻⁴ M acetylcholine投与によって弛緩することを観察することによって確認する。ラットurotensin II like peptide-1は終濃度10⁻¹⁰ - 10⁻⁷ Mとなるよう累積投与する。ラット頸動脈標本はラットurotensin II like peptide-1の添加によって用量依存的に収縮する。また、同様の活性はラットurotensin II like peptide-2(配列番号:15)あるいはマウスurotensin II like peptide(配列番号:27)を投与した場合にも確認される。

実施例1.6 ラットurotensin II like peptide-1が誘起するラットSENR細胞膜画分へのGTP + S結合活性の測定

実施例7で合成したラットurotensin II like peptide-1(配列番号:14)のラットSENR細胞膜画分に対する [³⁵S]-guanosine 5'-(-γ-thio)triphosphateの結合促進活性を以下の方針により測定する。最初に膜画分の調製法を記載する。1 x 10⁴個のCHO/rSENR細胞に10 mlのホモジネートバッファー(10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μg/ml pepstatin, 4 μg/ml E64, 20 μg/ml leupeptin)を添加し、ポリトロン(12,000 rpm, 1分間)を用いて破碎する。細胞破砕液を遠心(1,000 g, 15分間)して上清を得る。次にこの上清を超遠心分離(Beckman type 30ローター、30,000 rpm, 1時間)し、得

られた沈殿物をラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分とする。

GTP γ S 結合活性の測定は以下の通りである。ラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分を膜希釈緩衝液 (50 mM) トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 、5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、1 μ M GDP) で希釈して、タンパク質濃度 30 μ g/ml のアッセイ用細胞膜画分溶液をつくる。アッセイ用膜画分溶液 200 μ l に、51.5 nM の濃度の [³⁵S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (NEN 社) を 2 μ l と種々の濃度のラット urotensin II like peptide を 2 μ l 添加し、この混合液を 25°C で一時間保温する。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルター洗浄用バッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 、5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、0.1% BSA) 1.5 ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。ラット urotensin II like peptide-1 は、用量依存的に、膜画分に結合する [³⁵S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate 量を増大させる。また、同様の活性はラット urotensin II like peptide-2 (配列番号 : 15) もあるいはマウス urotensin II like peptide (配列番号 : 27) を投与した場合にも確認される。また、ラット urotensin II like peptide-1 および 2 あるいはマウス urotensin II like peptide を上記と同様にして作製したヒト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分に投与した場合にも確認される。

実施例 11 ラット urotensin II-like peptide-1 (以下 peptide-1) の合成
結合阻害実験に使用するためのアイソトープ標識ラット urotensin II-like peptide-1 を以下のようにして作製した。実施例 7 で合成したラット urotensin II-like peptide-1 (配列番号 : 14) 5 μ g を 25 μ l の 0.4 M 酢酸ナトリウム (pH 5.6) に溶解し、これに 200 ng のラクトバーオギシダーゼ (和光純薬) を加えた後、1 mM の [³H]-ヨウ化ナトリウム (アマチャムファルマバイオテク社) および 200 ng の過酸化水素 (10 μ l) を加えた。室温で 10 分間静置した

後、さらに 200 ng の過酸化水素 ($10 \mu\text{l}$) を加えて 10 分間静置した。これを TSkgel 0DS-80T₃ カラム (4.6 mm x 25 cm、トーソー) を用いた HPLC によって 精製し、「¹⁵³I】標識ラット urolansin [I] like peptide-1 を得た。また、同様の 「¹⁵³I】標識ラット urolansin [I] like peptide-2 (配列番号 : 16) あ

るいはマウス urotoxinin like peptide (配列番号 : 27) についても同様の操作を行なつて作製することが出来る。

実施例 1 8 アイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 と CHO/rSENR 細胞を使用した結合阻害実験

実施例 1 7 で作製した [¹²⁵I] 標識ラット urotensin II like peptide-1 とラット SENR 発現 CHO 細胞を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。 CHO [] 細胞を 24 ハブプレートに 5×10^4 cell/well で播種して 48 時間培養し、 その培養液を 0.05% BSA を含む MEM α 培地 0.5 ml で洗う (以下 0.05% BSA を含む MEM α 培地を反応用バッファーと呼ぶ)。 総結合を調べるために 10 pM [¹²⁵I] 標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファー、 非特異的結合を調べるために 10 pM [¹²⁵I] 標識ラット urotensin II like peptide-1 と $1 \mu \text{M}$ 非アアイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファー、 さらにラット SENR に対する結合活性を調べる試料と 10 pM [¹²⁵I] 標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファー、 各 0.5 ml をそれぞれ細胞に添加し、 室温で 30 分間反応させる。 細胞を反応用バッファーで洗浄した後、 0.5 N NaOH を 0.2 ml 添加して細胞を溶解し、 溶解物の放射活性をガンマカウント

である。被験試料のラットSENR結合活性は、総結合から試料を加えた細胞溶解物の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。また、同様の結合阻害実験は [^{31}I]標識したラットurotensin II like peptide-2 (配列番号 : 15) あるいはマウスurotensin II like peptide (配列番号 : 27) を用いても実施することができる。また、 [^{125}I] した標識ラットurotensin II like peptide-1 および-2あるいはマウスurotensin II like peptideとヒトSENR発現CHO細胞を用いても実施することができる。

実施例 19 アイソトープ標識ラット *urotensin II* like peptide-1 と CHO/rSENR 細胞膜画分を使用した結合阻害実験

ト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。実施例 1 6 に記載した、CHO/rSENR 細胞から調製した膜画分を「膜希釈緩衝液 (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、0.1% BSA、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF 、1 μg/ml pepstatin、4 μg/ml E64、20 μg/ml leupeptin)」で希釈して、タンパク質濃度 60 μg/ml のアセイ用細胞膜画分溶液をつくりた。アッセイ用膜画分溶液 100 μl に、結合を調べるために 20 pM [³⁵S] 標識ラット uro tensin II like peptide-1 を含む膜希釈緩衝液、非特異的結合を調べるために 20 pM [³⁵S] 標識ラット uro tensin II like peptide-1 と 2 μM 非アシソートープ標識ラット uro tensin II like peptide-1 を含む膜希釈緩衝液、さらにラット SENR に対する結合活性を調べる試料と 20 pM [³⁵S] 標識ラット uro tensin II like peptide-1 を含む膜希釈緩衝液、各 100 μl をそれぞれ添加して室温で 60 分間反応させた。混合液をフィルターを通過し、さらにフィルターを膜希釈緩衝液 1.5 ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性をガムマカウンターにより測定した。特異的結合は、結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のラット SENR 結合活性は、結合から試料を加えた細胞膜画分の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。この実験において非標識ラット uro tensin II like peptide-1 による結合阻害が観測され、その IC₅₀ 値は 1.2 nM であった。また、同様の結合阻害実験は [³⁵S] 標識したラット uro tensin II like peptide-2 (配列番号 : 15) あるいはマウス uro tensin II like peptide (配列番号 : 27) を用いても実施することができる。また、[³⁵S] 標識したラット uro tensin II like peptide-1 および-2 あるいはマウス uro tensin II like peptide とヒト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分を用いても実施することができる。
(配列表 フリーテキスト)

配列番号 : 1 4

配列番号 : 1 5

配列番号 : 2 5

配列番号 : 3 1

配列番号 : 3 2

配列番号 : 3 3

配列番号 : 3 4

配列番号 : 3 5

配列番号 : 3 6

配列番号 : 3 7

配列番号 : 3 8

配列番号 : 3 9

配列番号 : 3 10

配列番号 : 3 11

配列番号 : 3 12

配列番号 : 3 13

配列番号 : 3 14

配列番号 : 3 15

配列番号 : 3 16

配列番号 : 3 17

配列番号 : 3 18

配列番号 : 3 19

配列番号 : 3 20

配列番号 : 3 21

配列番号 : 3 22

配列番号 : 3 23

配列番号 : 3 24

配列番号 : 3 25

配列番号 : 3 26

配列番号 : 3 27

配列番号 : 3 28

配列番号 : 3 29

配列番号 : 3 30

配列番号 : 3 31

配列番号 : 3 32

配列番号 : 3 33

配列番号 : 3 34

配列番号 : 3 35

配列番号 : 3 36

配列番号 : 3 37

配列番号 : 3 38

配列番号 : 3 39

配列番号 : 3 40

配列番号 : 3 41

配列番号 : 3 42

配列番号 : 3 43

配列番号 : 3 44

配列番号 : 3 45

配列番号 : 3 46

配列番号 : 3 47

配列番号 : 3 48

配列番号 : 3 49

配列番号 : 3 50

配列番号 : 3 51

配列番号 : 3 52

配列番号 : 3 53

配列番号 : 3 54

配列番号 : 3 55

配列番号 : 3 56

配列番号 : 3 57

配列番号 : 3 58

配列番号 : 3 59

配列番号 : 3 60

配列番号 : 3 61

配列番号 : 3 62

配列番号 : 3 63

配列番号 : 3 64

配列番号 : 3 65

配列番号 : 3 66

配列番号 : 3 67

配列番号 : 3 68

配列番号 : 3 69

配列番号 : 3 70

配列番号 : 3 71

配列番号 : 3 72

配列番号 : 3 73

配列番号 : 3 74

配列番号 : 3 75

配列番号 : 3 76

配列番号 : 3 77

配列番号 : 3 78

配列番号 : 3 79

配列番号 : 3 80

配列番号 : 3 81

配列番号 : 3 82

配列番号 : 3 83

配列番号 : 3 84

配列番号 : 3 85

配列番号 : 3 86

配列番号 : 3 87

配列番号 : 3 88

配列番号 : 3 89

配列番号 : 3 90

配列番号 : 3 91

配列番号 : 3 92

配列番号 : 3 93

配列番号 : 3 94

配列番号 : 3 95

配列番号 : 3 96

配列番号 : 3 97

配列番号 : 3 98

配列番号 : 3 99

配列番号 : 3 100

配列番号 : 3 101

配列番号 : 3 102

配列番号 : 3 103

配列番号 : 3 104

配列番号 : 3 105

配列番号 : 3 106

配列番号 : 3 107

配列番号 : 3 108

配列番号 : 3 109

配列番号 : 3 110

配列番号 : 3 111

配列番号 : 3 112

配列番号 : 3 113

配列番号 : 3 114

配列番号 : 3 115

配列番号 : 3 116

配列番号 : 3 117

配列番号 : 3 118

配列番号 : 3 119

配列番号 : 3 120

配列番号 : 3 121

配列番号 : 3 122

配列番号 : 3 123

配列番号 : 3 124

配列番号 : 3 125

配列番号 : 3 126

配列番号 : 3 127

配列番号 : 3 128

配列番号 : 3 129

配列番号 : 3 130

配列番号 : 3 131

配列番号 : 3 132

配列番号 : 3 133

配列番号 : 3 134

配列番号 : 3 135

配列番号 : 3 136

配列番号 : 3 137

配列番号 : 3 138

配列番号 : 3 139

配列番号 : 3 140

配列番号 : 3 141

配列番号 : 3 142

配列番号 : 3 143

配列番号 : 3 144

配列番号 : 3 145

配列番号 : 3 146

配列番号 : 3 147

配列番号 : 3 148

配列番号 : 3 149

配列番号 : 3 150

配列番号 : 3 151

配列番号 : 3 152

配列番号 : 3 153

配列番号 : 3 154

配列番号 : 3 155

配列番号 : 3 156

配列番号 : 3 157

配列番号 : 3 158

配列番号 : 3 159

配列番号 : 3 160

配列番号 : 3 161

配列番号 : 3 162

配列番号 : 3 163

配列番号 : 3 164

配列番号 : 3 165

配列番号 : 3 166

配列番号 : 3 167

配列番号 : 3 168

配列番号 : 3 169

配列番号 : 3 170

配列番号 : 3 171

配列番号 : 3 172

配列番号 : 3 173

配列番号 : 3 174

配列番号 : 3 175

配列番号 : 3 176

配列番号 : 3 177

配列番号 : 3 178

配列番号 : 3 179

配列番号 : 3 180

配列番号 : 3 181

配列番号 : 3 182

配列番号 : 3 183

配列番号 : 3 184

配列番号 : 3 185

配列番号 : 3 186

配列番号 : 3 187

配列番号 : 3 188

配列番号 : 3 189

配列番号 : 3 190

配列番号 : 3 191

配列番号 : 3 192

配列番号 : 3 193

配列番号 : 3 194

配列番号 : 3 195

配列番号 : 3 196

配列番号 : 3 197

配列番号 : 3 198

配列番号 : 3 199

配列番号 : 3 200

配列番号 : 3 201

配列番号 : 3 202

配列番号 : 3 203

配列番号 : 3 204

配列番号 : 3 205

配列番号 : 3 206

配列番号 : 3 207

配列番号 : 3 208

配列番号 : 3 209

配列番号 : 3 210

配列番号 : 3 211

配列番号 : 3 212

配列番号 : 3 213

配列番号 : 3 214

配列番号 : 3 215

配列番号 : 3 216

配列番号 : 3 217

配列番号 : 3 218

配列番号 : 3 219

配列番号 : 3 220

配列番号 : 3 221

配列番号 : 3 222

配列番号 : 3 223

配列番号 : 3 224

配列番号 : 3 225

配列番号 : 3 226

配列番号 : 3 227

配列番号 : 3 228

配列番号 : 3 229

配列番号 : 3 230

配列番号 : 3 231

配列番号 : 3 232

配列番号 : 3 233

配列番号 : 3 234

配列番号 : 3 235

配列番号 : 3 236

配列番号 : 3 237

配列番号 : 3 238

配列番号 : 3 239

配列番号 : 3 240

配列番号 : 3 241

配列番号 : 3 242

配列番号 : 3 243

配列番号 : 3 244

配列番号 : 3 245

配列番号 : 3 246

配列番号 : 3 247

配列番号 : 3 248

配列番号 : 3 249

配列番号 : 3 250

配列番号 : 3 251

配列番号 : 3 252

配列番号 : 3 253

配列番号 : 3 254

配列番号 : 3 255

配列番号 : 3 256

配列番号 : 3 257

配列番号 : 3 258

配列番号 : 3 259

配列番号 : 3 260

配列番号 : 3 261

配列番号 : 3 262

配列番号 : 3 263

配列番号 : 3 264

配列番号 : 3 265

配列番号 : 3 266

配列番号 : 3 267

配列番号 : 3 268

配列番号 : 3 269

配列番号 : 3 270

配列番号 : 3 271

配列番号 : 3 272

配列番号 : 3 273

配列番号 : 3 274

配列番号 : 3 275

配列番号 : 3 276

配列番号 : 3 277

配列番号 : 3 278

配列番号 : 3 279

配列番号 : 3 280

配列番号 : 3 281

配列番号 : 3 282

配列番号 : 3 283

配列番号 : 3 284

配列番号 : 3 285

配列番号 : 3 286

配列番号 : 3 287

配列番号 : 3 288

配列番号 : 3 289

配列番号 : 3 290

配列番号 : 3 291

配列番号 : 3 292

配列番号 : 3 293

配列番号 : 3 294

配列番号 : 3 295

配列番号 : 3 296

配列番号 : 3 297

配列番号 : 3 298

配列番号 : 3 299

配列番号 : 3 300

配列番号 : 3 301

配列番号 : 3 302

配列番号 : 3 303

配列番号 : 3 304

配列番号 : 3 305

配列番号 : 3 306

配列番号 : 3 307

配列番号 : 3 308

配列番号 : 3 309

配列番号 : 3 310

配列番号 : 3 311

配列番号 : 3 312

配列番号 : 3 313

配列番号 : 3 314

配列番号 : 3 315

配列番号 : 3 316

配列番号 : 3 317

配列番号 : 3 318

配列番号 : 3 319

配列番号 : 3 320

配列番号 : 3 321

配列番号 : 3 322

配列番号 : 3 323

配列番号 : 3 324

配列番号 : 3 325

配列番号 : 3 326

配列番号 : 3 327

配列番号 : 3 328

配列番号 : 3 329

配列番号 : 3 330

配列番号 : 3 331

配列番号 : 3 332

配列番号 : 3 333

配列番号 : 3 334

配列番号 : 3 335

配列番号 : 3 336

配列番号 : 3 337

配列番号 : 3 338

配列番号 : 3 339

配列番号 : 3 340

配列番号 : 3 341

配列番号 : 3 342

配列番号 : 3 343

配列番号 : 3 344

配列番号 : 3 345

配列番号 : 3 346

配列番号 : 3 347

配列番号 : 3 348

配列番号 : 3 349

配列番号 : 3 350

配列番号 : 3 351

配列番号 : 3 352

配列番号 : 3 353

配列番号 : 3 354

配列番号 : 3 355

配列番号 : 3 356

配列番号 : 3 357

配列番号 : 3 358

配列番号 : 3 359

配列番号 : 3 360

配列番号 : 3 361

配列番号 : 3 362

配列番号 : 3 363

配列番号 : 3 364

配列番号 : 3 365

配列番号 : 3 366

配列番号 : 3 367

配列番号 : 3 368

配列番号 : 3 369

配列番号 : 3 370

配列番号 : 3 371

配列番号 : 3 372

配列番号 : 3 373

配列番号 : 3 374

配列番号 : 3 375

配列番号 : 3 376

配列番号 : 3 377

配列番号 : 3 378

配列番号 : 3 379

配列番号 : 3 380

配列番号 : 3 381

配列番号 : 3 382

配列番号 : 3 383

配列番号 : 3 384

配列番号 : 3 385

配列番号 : 3 386

配列番号 : 3 387

配列番号 : 3 388

配列番号 : 3 389

配列番号 : 3 390

配列番号 : 3 391

配列番号 : 3 392

配列番号 : 3 393

配列番号 : 3 394

配列番号 : 3 395

配列番号 : 3 396

配列番号 : 3 397

配列番号 : 3 398

配列番号 : 3 399

配列番号 : 3 400

配列番号 : 3 401

配列番号 : 3 402

配列番号 : 3 403

配列番号 : 3 404

配列番号 : 3 405

配列番号 : 3 406

配列番号 : 3 407

配列番号 : 3 408

配列番号 : 3 409

配列番号 : 3 410

配列番号 : 3 411

配列番号 : 3 412

配列番号 : 3 413

配列番号 : 3 414

配列番号 : 3 415

配列番号 : 3 416

配列番号 : 3 417

配列番号 : 3 418

配列番号 : 3 419

配列番号 : 3 420

配列番号 : 3 421

配列番号 : 3 422

配列番号 : 3 423

配列番号 : 3 424

配列番号 : 3 425

配列番号 : 3 426

配列番号 : 3 427

配列番号 : 3 428

配列番号 : 3 429

配列番号 : 3 430

配列番号 : 3 431

配列番号 : 3 432

配列番号 : 3 433

配列番号 : 3 434

配列番号 : 3 435

配列番号 : 3 436

配列番号 : 3 437

配列番号 : 3 438

配列番号 : 3 439

配列番号 : 3 440

配列番号 : 3 441

配列番号 : 3 442

配列番号 : 3 443

配列番号 : 3 444

配列番号 : 3 445

配列番号 : 3 446

配列番号 : 3 447

配列番号 : 3 448

配列番号 : 3 449

配列番号 : 3 450

配列番号 : 3 451

配列番号 : 3 452

配列番号 : 3 453

配列番号 : 3 454

配列番号 : 3 455

配列番号 : 3 456

配列番号 : 3 457

配列番号 : 3 458

配列番号 : 3 459

配列番号 : 3 460

配列番号 : 3 461

配列番号 : 3 462

配列番号 : 3 463

配列番号 : 3 464

配列番号 : 3 465

配列番号 : 3 466

配列番号 : 3 467

配列番号 : 3 468

配列番号 : 3 469

配列番号 : 3 470

配列番号 : 3 471

配列番号 : 3 472

配列番号 : 3 473

配列番号 : 3 474

配列番号 : 3 475

配列番号 : 3 476

配列番号 : 3 477

配列番号 : 3 478

配列番号 : 3 479

配列番号 : 3 480

配列番号 : 3 481

配列番号 : 3 482

配列番号 : 3 483

配列番号 : 3 484

配列番号 : 3 485

配列番号 : 3 486

配列番号 : 3 487

配列番号 : 3 488

配列番号 : 3 489

配列番号 : 3 490

配列番号 : 3 491

配列番号 : 3 492

配列番号 : 3 493

配列番号 : 3 494

配列番号 : 3 495

配列番号 : 3 496

配列番号 : 3 497

配列番号 : 3 498

配列番号 : 3 499

配列番号 : 3 500

配列番号 : 3 501

配列番号 : 3 502

配列番号 : 3 503

配列番号 : 3 504

配列番号 : 3 505

配列番号 : 3 506

配列番号 : 3 507

配列番号 : 3 508

配列番号 : 3 509

配列番号 : 3 510

配列番号 : 3 511

配列番号 : 3 512

配列番号 : 3 513

配列番号 : 3 514

配列番号 : 3 515

配列番号 : 3 516

配列番号 : 3 517

配列番号 : 3 518

配列番号 : 3 519

配列番号 : 3 520

配列番号 : 3 521

配列番号 : 3 522

配列番号 : 3 523

配列番号 : 3 524

配列番号 : 3 525

配列番号 : 3 526

配列番号 : 3 527

配列番号 : 3 528

配列番号 : 3 529

配列番号 : 3 530

配列番号 : 3 531

配列番号 : 3 532

配列番号 : 3 533

配列番号 : 3 534

配列番号 : 3 535

配列番号 : 3 536

配列番号 : 3 537

配列番号 : 3 538

配列番号 : 3 539

配列番号 : 3 540

配列番号 : 3 541

配列番号 : 3 542

配列番号 : 3 543

配列番号 : 3 544

配列番号 : 3 545

配列番号 : 3 546

配列番号 : 3 547

配列番号 : 3 548

配列番号 : 3 549

配列番号 : 3 550

配列番号 : 3 551

配列番号 : 3 552

配列番号 : 3 553

配列番号 : 3 554

配列番号 : 3 555

配列番号 : 3 556

配列番号 : 3 557

配列番号 : 3 558

配列番号 : 3 559

配列番号 : 3 560

配列番号 : 3 561

配列番号 : 3 562

配列番号 : 3 563

配列番号 : 3 564

配列番号 : 3 565

配列番号 : 3 566

配列番号 : 3 567

配列番号 : 3 568

配列番号 : 3 569

配列番号 : 3 570

配列番号 : 3 571

配列番号 : 3 572

配列番号 : 3 573

配列番号 : 3 574

配列番号 : 3 575

配列番号 : 3 576

配列番号 : 3 577

配列番号 : 3 578

配列番号 : 3 579

配列番号 : 3 580

配列番号 : 3 581

配列番号 : 3 582

配列番号 : 3 583

配列番号 : 3 584

配列番号 : 3 585

配列番号 : 3 586

配列番号 : 3 587

配列番号 : 3 588

配列番号 : 3 589

配列番号 : 3 590

配列番号 : 3 591

配列番号 : 3 592

配列番号 : 3 593

配列番号 : 3 594

配列番号 : 3 595

配列番号 : 3 596

配列番号 : 3 597

配列番号 : 3 598

配列番号 : 3 599

配列番号 : 3 600

配列番号 : 3 601

配列番号 : 3 602

配列番号 : 3 603

配列番号 : 3 604

配列番号 : 3 605

配列番号 : 3 606

配列番号 : 3 607

配列番号 : 3 608

配列番号 : 3 609

配列番号 : 3 610

配列番号 : 3 611

配列番号 : 3 612

配列番号 : 3 613

配列番号 : 3 614

配列番号 : 3 615

配列番号 : 3 616

配列番号 : 3 617

配列番号 : 3 618

配列番号 : 3 619

配列番号 : 3 620

配列番号 : 3 621

配列番号 : 3 622

配列番号 : 3 623

配列番号 : 3 624

配列番号 : 3 625

配列番号 : 3 626

配列番号 : 3 627

配列番号 : 3 628

配列番号 : 3 629

配列番号 : 3 630

配列番号 : 3 631

配列番号 : 3 632

配列番号 : 3 633

配列番号 : 3 634

配列番号 : 3 635

配列番号 : 3 636

配列番号 : 3 637

配列番号 : 3 638

配列番号 : 3 639

配列番号 : 3 640

配列番号 : 3 641

配列番号 : 3 642

配列番号 : 3 643

配列番号 : 3 644

配列番号 : 3 645

配列番号 : 3 646

配列番号 : 3 647

配列番号 : 3 648

配列番号 : 3 649

配列番号 : 3 650

配列番号 : 3 651

配列番号 : 3 652

配列番号 : 3 653

配列番号 : 3 654

配列番号 : 3 655

配

請求の範囲

1. 配列番号：1 4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：1 4 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1 5、配列番号：2 7、配列番号：3 1、配列番号：3 2、配列番号：3 3 または配列番号：3 4 で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチド。
3. 配列番号：1 4、配列番号：1 5、配列番号：2 7、配列番号：3 1、配列番号：3 2、配列番号：3 3 または配列番号：3 4 で表されるアミノ酸配列を有する請求項1記載のポリペプチド。
4. 請求項1記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
5. 配列番号：1 3 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項4記載の前駆体タンパク質。
6. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
7. 配列番号：1 6、配列番号：1 7、配列番号：2 8、配列番号：3 5、配列番号：3 6、配列番号：3 7 または配列番号：3 8 で表される塩基配列を有する請求項6記載のDNA。

8. 請求項4記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

9. 配列番号：1 2 または配列番号：2 5 で表される塩基配列を有する請求項8記載のDNA。

10. 請求項6または請求項8記載のDNAを含有する組換えベクター。

11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

13. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

14. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

15. 請求項6または請求項8記載のDNAを含有してなる医薬。

16. 中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤または感觉器官機能調節剤である請求項1 4 または請求項15記載の医薬。

17. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載の医薬。

5 るSEN Rと請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 5 18. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするSEN Rと請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

15

19. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、SEN Rと請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

15

20. 請求項13記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法。

20

21. 請求項13記載の抗体を含有することを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩が関与する疾患の診断剤。

☒ 1

1 T CTT CCC GTC ATC GAC AGG GTG CCC TTC TGC CTG CTC GTC GAA CTC CTG
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu
10
20 AAT CCA CTC CTG TCT TTT CCC GTC ACC GAC ACT GGT GAA ATG TGT CTT CAG CTT CCA GTG
Asn Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Glu Leu Pro Val
30
40 CTT GAG GAA AAT CCT CTT CCC GCT CTC GAG GAG CTC GAG AGG ACT GGC CTC CTC CAG ACC ATG
Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Arg Thr Ala Leu Leu Thr
50
60 CTG CCC CAG ACC GTC GGC ACA GAA GCA GAC GGA AAG CTT GGC CAG GCA GAT CCC AGT GCC
Leu Arg Gln Thr Val Gly Ser Leu Glu Ala Glu Gly Ser Leu Gly Glu Ala Asp Pro Ser Ala
70
80 GAG ACT CCC ACT CCA AAG GGA AGC TGC TGG AAG GCT CTC ACT GGG CAA GAT TCT AAC ACT
Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Glu Gln Asp Ser Asn Thr
90
100 GAA CTC AGC CGT CTT TGC GCG AGA ACC AGG AAA CAA CGT AAG CAA CAC GGG ACT GGC CCA
Val Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Glu Arg Lys Glu His Gly Thr Ala Pro
110
120 GAA TGC TTC TGG AAG TAC TGC ATT TGA AGA GAG ACC TCT CCT CAG AA
Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile ***

☒ 2

1 ATG GAC AGG GTG CCC TTC TGC TGC CTC TTC ATA GGA CTT CTG AAT CCA CTC CTG CTG
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser
10
20 CTT CCC GTC ACC GAC ACT CCT GAG AGG ACT CTT CAG CTT CCA GTG CTT GAG GAC GAC
Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Glu Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala
30
40 CTT CGG CCT CTG CAG GAG CTC GAG AGG ATG GCC CTC CTC CAG ACC CTG CGT CAG ACC ATG
Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met
50
60 GGC ACG GAA GCA GGG GAG AGC CCT GGA GAA GCA GGT CCC AGC ACT GAG ACT CCC ACT CCA
Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro
70
80 CGG GCA ACC ATG AGG AAG GCT TTC GCT GGG CAA ATT TCT AAC ACT GTC ACT CGT CTC
Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
90
100 TTG GCA AGA ACC AGG AAA CAA CAT AAC GAA CAC GGG GCT GCC CCA GAG TGC TTC TGG
Leu Ala Arg Thr Arg Lys Glu His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys
110
120
123 TAC TGC ATT TGA GGA GAC AGC GCC CGT TGG TCT CTC AGA A
Tyr Cys Ile ***

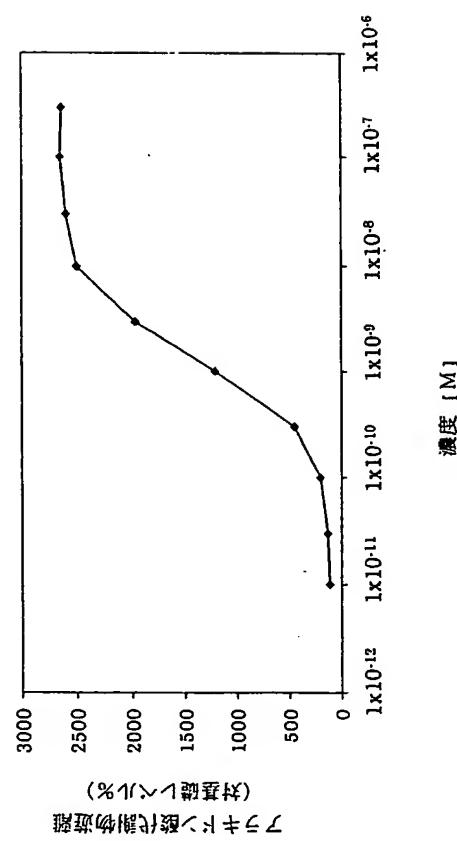


図3

3/3

SEQUENCE LISTING

CACTGACTG AGCCGTCTT TGGCGAAC CAGGAACAA CGTAAGAAC ACGGGACTGC 60

CCCAGAA

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Physiologically Active Substance, Its Production and Use

<130> 2637W0P

<150> JP 11-194091

<151> 1999-07-08

<160> 38

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 4

CCAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 4

10 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 5

10 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 6

15 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 349

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 6

20 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

25 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

30 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

35 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

40 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

45 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

50 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

55 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<210> 3

60 CGAGAGCAT TCTGGGAG TCCCGTC 27

CTCACTGGGC AAGATTCTAA CACTGACTG ACCUGTCRIT TGGCGAGAA

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

GACAAAGATC CTAACACTGT ACTGAGCCG 29

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

GAAACAAACGT AAGCAACAGG GGAC 24

<210> 9

<211> 274

<212> DNA

<213> Ral

<400> 9

GGCGCTTTT GGGCGAAACC AGGAAACAC GTAACCAACA CGGAGCTGCC CCAGATGCT

TCTGGAAAGTA CTGCATTGTA AGAGAGACGT CTCCCTAGAA CCATCACTTC AGGAACACTAA

<210> 10

<211> ??

349 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

5 <400> 10

GAGGAGACAA CCCAGCCAGA CT 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

15 <400> 11

CTTTAGTTTC CTGAAGTGTAT GG 22

<212> DNA

<213> Ral

<400> 12

TCTTCCGTC GTCATGGACA GGTTGCCCTT CTGGTGCCTG CTCTTCGTAG GACTCCGTAA

TCCACTCCTG TCTTTCCCG TCACGGACAC TGGTGAATG TCTCTTCAGC TTCCAGTGTCT

20 TGAGGAAAT GCTCTTCGGG CTCTGGAGGA GCTGGAGAGG ACTGCCCTC TGCAGACGCT

GCCGAGACCC GTGGCACAG AAGCAGAGGG AAGCCTGGC CAGGAGATC CCAGTGGCGA

GACTCCACI CCAAGGGAA GCTTGAGGA GGCTCTCACT GGGCAAGATT CTAACACTGT

25 ACTGAGCCGT CTTTGGCGA GAACCGAGAA ACAAGTAG CAACAGGGA CTGGCCCGAGA

ATGCTTCTGG AACTACTGCA TTGAAAGAGA GACCTCTCT CAGAA 405

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> Rat
 <400> 13
 Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn
 1 5 10 15
 5 Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln
 20 25 30
 Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
 35 40 45
 Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Gln Ala
 40 50 55 60
 65 Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro
 70 75 80
 Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
 85 90 95
 15 Leu Ser Arg Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly
 100 105 110
 Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 115 120
 <210> 14
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rat
 <223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine
 <400> 14
 25 Xaa Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 1 10 17
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Rat
 <223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine
 <400> 15
 Xaa His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 5 1 10 14
 <210> 16
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 16
 CAACCTAGC AACACGGGACT GCCCCAGAA TGCTTCTGGA ACTACTGGAT T 51
 10 <210> 17
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 17
 CAAACCGGA CTGGCCAGA ATGCCTCTGG AAGTACTGCCA TT 42
 15 <210> 18
 <211> 22
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223>
 <400> 18
 25 GGAGCAGACCCAGCCAGA CT 22
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 22
 CTTTACTTTTC CTGAAGTGT GC 22
 <210> 23
 <211> 107
 5 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 23
 TCTCTGGCA AGAACAGGA AACAAACATA GAAACAGGG GCTGGCCAG ACTGCTCTG
 GAAATACTGC ATTGGGGG ACACAGCCC CGCTGGTCT CTCAGAA 60
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 24
 TCTCGGGCA TCATGGACAG GGTGCCCTTC TGCTGCTGC TCTTATAGG ACTCTGAT
 60
 CCACTGGCT CCCTTCCGT CACGGACAT GGTGAGGA CTCTCTAGGT TCCAGTGCTT
 120
 GAGGAAGAG CTCCTGGGC TCTGGAGGA CTGGAGGA TGGCCCTCT GCAGACCCCTG
 180
 CGTCAGACCA TGGCACCGA ACCAGGGAG AGCCCTGGAG AAGCAGTCC CAGGACTGAG
 240
 ACTCCACTC CAGGGGAG CATGGAGA GCTTGGCTG GGCAAAATT TAACACTGTA
 300
 CTGAGTGTC TCTGGCAAG AACAGAAA CAACATAAGC AACACGGGCC TGCC
 354
 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 25
 ACCCACACGT CTGGGGCAT C 21
 <210> 25
 <211> 403
 20 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 25
 ATGGACAGGG TGCCTCTG CTGCCTGCTC TTCTAGAC TTCTGAATCC ACTGCTGTC
 60
 CTTCGGCTCA CGACACTGG TGAGGAGCT CTTCACTTC CAGTCCTGA GAAAGACGCT
 120
 25 CTTCGGCTC TGGAGGAGT CGAGGAGAT GGCCTCTGC AGACCTCTGC TCAAGACCATG
 180
 GCACCGAAG CAGGGAGAG CCCTGGAGAA GCAGGTCCTA GCACTGAGAC TCCCACTCCA
 240
 CGGGAAAGCA TGAGGAGGC TTTCGGTGGG CAAAATTCTA ACACGTACT GAGTCGTCTC
 300
 TGGCAAGAA CCAGAAACA ACATAAGCA CACGGGGCTG CCCAGAGTC TTTCCTGGAAA
 360
 TACTGGATT GAGGACAC AGGCCCGT TGGCTCTCA GAA
 <223>

	Xaa His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
	5 10 15 17
<210> 26	<210> 28
<211> 123	<211> 51
<212> PRT	<212> DNA
<213> Mouse	<213> Mouse
5 <400> 26	<400> 28
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu	CAACATAGC AACACGGGC TGCCCGAGAG TGCTCTGGA AAATCTGCAT T
1 5	20
Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr	25
20 25	30
Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu	10 <210> 29
10 35	<211> 386
Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met	<212> PRT
50 55	<213> Rat
Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr	<400> 29
65 70	Met Ala Leu Ser Leu Glu Ser Thr Ser Phe His Met Leu Thr Val
Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly	15 1 5 10 15
80 85	Ser Gly Ser Thr Val Thr Glu Leu Pro Glu Asp Ser Asn Val Ser Leu
Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg	20 25 30
95 100	Asn Ser Ser Trp Ser Gly Pro Thr Asp Pro Scr Ser Leu Lys Asp Leu
Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys	35 40 45
110 115	Val Ala Thr Gly Val Ile Gly Ala Val Leu Ser Ala Met Gly Val Val
Tyr Cys Ile	50 55 60
123	Gly Met Val Gly Asn Val Tyr Thr Leu Val Val Met Cys Arg Phe Leu
	65 70 75 80
<210> 27	Arg Ala Ser Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Lys Ala Leu Ala
<211> 17	25 85 90 95
<212> PRT	Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Ile Ala Thr Tyr Val
<213> Mouse	100 105 110
<223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine	Thr Lys Asp Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Ser
<400> 27	115 120 125

Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Ile Met
 130 135 140
 Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gin
 145 150 155 160
 5 Arg Ser Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Val Leu Gly Thr Trp Leu Leu
 165 170 175
 Ala Leu Leu Thr Leu Pro Met Met Leu Ala Ile Gin Leu Val Arg
 180 185 190
 Arg Gly Ser Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His
 195 200 205
 10 Arg Thr Tyr Leu Thr Leu Leu Phe Gly Thr Ser Ile Val Gly Pro Gly
 210 215 220
 Leu Val Ile Gly Leu Leu Tyr Val Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Trp Leu
 225 230 235 240
 15 Ser Gin Gin Ala Ser Phe Lys Gin Thr Arg Arg Leu Pro Asn Pro Arg
 245 250 255
 Val Leu Tyr Leu Ile Leu Gly Ile Val Leu Phe Trp Ala Cys Phe
 260 265 270
 Leu Pro Phe Trp Leu Trp Gin Leu Leu Ala Gin Tyr His Glu Ala Met
 275 280 285
 20 Pro Leu Thr Pro Glu Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Thr Cys
 290 295 300
 Leu Thr Tyr Gly Asn Ser Cys Ile Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Leu
 305 310 315 320
 25 Thr Lys Asn Tyr Arg Glu Tyr Leu Arg Gly Arg Ser Leu Gin
 325 330 335
 Ser Ser Cys His Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Phe Leu Pro Ser Arg
 340 345 350
 Val His Leu Gin Gin Asp Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Ser Gin

355 360 365
 Gin Ala Thr Glu Thr Leu Met Leu Ser Pro Val Pro Arg Asn Gly Ala
 370 375 380
 Leu Leu
 385
 <210> 30
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Human
 <214> 30
 Met Ala Leu Thr Pro Glu Ser Pro Ser Phe Pro Gly Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Ser Val Pro Glu Pro Pro Gly Gly Pro Asn Ala Thr Leu
 20 25 30
 Asn Ser Ser Trp Ala Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Leu Glu Asp Leu
 35 40 45
 Val Ala Thr Gly Thr Ile Gly Thr Leu Leu Ser Ala Met Gly Val Val
 50 55 60
 Gly Val Val Gly Asn Ala Tyr Thr Val Val Val Cys Arg Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ala Val Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Leu Ala Leu Ala
 85 90 95
 Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Val Ala Thr Tyr Val
 100 105 110
 25 Thr Lys Glu Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Gly
 115 120 125
 Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Val Met
 130 135 140
 Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gin

145	150	155	160	Pro Arg Ala Pro Ala
	Arg Pro Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Leu Ala Leu Gly Thr Trp Leu Leu			
	165	170	175	385
	Ala Leu Leu Thr Leu Pro Val Met Leu Ala Met Arg Leu Val Arg			<210> 31
5	180	185	190	<211> 20
	Arg Gly Pro Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His			<212> PRT
	195	200	205	<213> Rat
	Arg Ala Tyr Leu Thr Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ile Ala Gly Pro Gly			<400> 31
	210	215	220	Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp
				1 5 10 15
10	Leu Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Arg Arg			
	225	230	235	10 Lys Tyr Cys Ile
	Ser Gln Arg Ala Ser Phe Lys Arg Ala Arg Pro Gly Ala Arg Ala			20
	245	250	255	<210> 32
	Leu Arg Leu Val Leu Gly Ile Val Leu Leu Phe Trp Ala Cys Phe Leu			<211> 24
15	260	265	270	<212> PRT
	Pro Phe Trp Leu Trp Gln Leu Leu Ala Gln Tyr His Gln Ala Pro Leu			<213> Rat
	275	280	285	<400> 32
	Ala Pro Arg Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Thr Cys Leu Thr			Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro
	290	295	300	1 5 10 15
	Tyr Gly Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Thr Arg			Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
20	305	310	315	20 20 24
	Asn Tyr Arg Asp His Leu Arg Gly Arg Val Arg Pro Gly Ser Gly			<210> 33
	325	330	335	<211> 20
	Gly Gly Arg Gly Pro Val Pro Ser Leu Gln Pro Arg Ala Arg Phe Gln			<212> PRT
25	340	345	350	<213> Mouse
	Arg Cys Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Cys Ser Pro Gln Pro Thr Asp			<400> 33
	355	360	365	Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp
	Leu Val Leu Ala Pro Ala Ala Pro Ala Arg Pro Ala Pro Glu Gly			1 5 10 15
	370	375	380	Lys Tyr Cys Ile

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 34

Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys 11c
 20 24

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Rat

<400> 35

ACCAAGAAAC AACGTAAGCA ACACGGACT GCCCGAAAT GCTCTGGAA GTACTGCATT
 <210> 36

<211> 72

<212> DNA

<213> Rat

<400> 36

CTTTGGGA GAACAGGAA AACAGTAAG CAACACGGG CTGCCAGAA ATGCTCTGG
 AACTACTGCA TT 72
 <210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 37

ACCAAGAAAC AACATTAAGCA ATACGGGGCT GCCCCAGAGT GCTCTGGAA ATACGCAATT
 <210> 38

国際特許報告		国際出願番号 PCT/JP00/04484
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. C 12' C 12N 1/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C 07K 14/47, 16/18, 7/08, C 12P 21/02, A 61K 38/10, 38/17, 4/8/00, A 61P 25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/10, 27/00, G 01N 33/53, 33/56		
B. 脳炎を行った分野		
脳炎を行った細小脳質料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. C 12' C 12N 15/00-15/90, C 07K 1/00-19/00		
脳炎で使用した電子データベース (データベースの名称、脳炎に使用した用語)		
PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)		
C. 開題すると思われる文献		
引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が開題するときは、その開題する箇所の表示	開題する箇所の番号 請求の範囲の番号
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 265 (1), Nov. 1999 Masaki Mori et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)", p. 123-129	1 - 2 1
P, X	Nature, 401, Sep. 1999 Robert S. Ames et al., "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14", p. 282-286	1 - 2 1
図 C欄の様さにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パンフレットファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に開題のある文献ではなく、一般的な技術書を示す 「E」国際出版日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「I」優先権主張に係る文書を示す 「O」口頭による開示、使用、展示等に育成する文献 「P」国際出願日前、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 以後に公表されたもの 「I」特に開題のある文献又は他の文献の発行 「O」特に開題の理由を確立するために引用する 「P」開示の理由と付す 「Y」特に開題の文書が他の文書と他の1以上の文献との、当該者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考へられるもの 「&」同一アシントアミリー文書</p>		
国際出願を完了した日	17. 10. 00	国際特許報告の発送日
国際特許査定の名前及びおてて先		
日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番3号	特許庁査定官 (権限のある職員) 特許士 森理子	4 B 9 8 3 8 印
電話番号 03-3581-1101	内線 3448	

国際特許報告

国際出願番号 PCT/JP00/04484

開題すると思われる文献

引用文献のカテゴリー*

請求の範囲の番号

請求の範囲の番号

開題する

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/04484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, 7/08, C12P21/02,
A61K38/10, 38/17, 48/00, A61P25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/12, 9/10,
27/00, G01N33/53, 33/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
Int. Cl. C12N15/00-15/90, C07K1/00-19/00

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
PIR/SWISSPROT/GENSEQ
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
GENBANK/DBDBJ/EMBL/GENESEQ
PIR/SWISSPROT/GENSEQ
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 265(1), Nov.1999, Maasaki Mori et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)", p.123-129	1-21
P, X	Nature, 401, Sep.1999, Robert S. Ames et al., "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14", p.283-286	1-21
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 266(1), Dec.1999 Liu Qingyun et al., "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein- coupled- receptor GPR14", p.174-178	1-21
P, X	PEBS Letters, 457, Aug. 20 1999, Yolaine Coulouarn et al., "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors", p.28-32	1-16, 20-21 17-19
P, X	WO, 2000-32627, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD), 08 June, 2000 (08.06.00), Full text	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- *P* document member of the same patent family

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)
31 October, 2000 (31.10.00)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/04484

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, Dec.1998 Yolaine Coulouarn et al., "Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord", p.15803-15808	1-21
A	Bur. J. Pharmacol., 149(1-2), 1988 Itoh H. et al., "Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries", p.61-66	1-21